

ホルモン受容体陽性マウス乳癌 FM3A 細胞における  
リポタンパク質リパーゼの調節機構に関する研究

2022 年

福山大学大学院 薬学研究科

医療薬学専攻 博士課程

藤井 朋保

## 目次

緒論 .....	1
第 1 章 プロゲステロンによるマウス乳癌 FM3A 細胞からの LPL の分泌機構の解析	
第 1 節 序論 .....	4
第 2 節 実験方法 .....	6
第 3 節 結果 .....	9
第 4 節 考察 .....	20
第 2 章 エストロゲンによる LPL 活性化機構の解析	
第 1 節 序論 .....	22
第 2 節 実験方法 .....	24
第 3 節 結果 .....	26
第 4 節 考察 .....	37
第 3 章 細胞周期に対する分子標的薬による脂質代謝の変動に関する解析	
第 1 節 序論 .....	38
第 2 節 実験方法 .....	40
第 3 節 結果 .....	43
第 4 節 考察 .....	54
総括 .....	56
謝辞 .....	58
引用文献 .....	59
論文目録 .....	69

## 略語一覽

AC	Adenylate Cyclase
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
BMI	Body Mass Index
CaM	Calmodulin
CaMKK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase
CDK	Cyclin Dependent Kinase
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
E2	17 $\beta$ -Estradiol
ER	Estrogen Receptor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Free Fatty Acid
GPOR	G Protein-Coupled Estrogen Receptor
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
LPL	Lipoprotein Lipase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MPA	Medroxyprogesterone Acetate
mTORC	Mechanistic Target of Rapamycin Complex
MPA	Medroxyprogesterone Acetate
mPRs	Membrane Progesterone Receptors

PGRMC	Progesterone Receptor Membrane Component
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PR	Progesterone Receptor
QOL	Quality of Life
TG	Triacylglycerol
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## 緒論

近年、我が国の乳癌罹患率は年々増加の一途を辿っており、現在その罹患者数は女性の癌患者の中で第1位である[1]。最近のコホート研究により、我が国における乳癌発症の原因として、体格指数 (Body Mass Index: BMI) の増加すなわち肥満にあることが示されている[2]。肥満患者における乳癌多発の原因としては、脂肪細胞の肥大化に伴う、アロマターゼの発現増加によるエストロゲン合成の増加及びアディポサイトカインの内、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : TNF- $\alpha$ ) やレプチンなどの分泌の増加並びにアディポネクチンの分泌減少などが乳癌発症率の増加に繋がっていることが示唆されている[3-6]。乳癌細胞の特徴としてホルモン受容体であるエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER) 及びプロゲステロン受容体 (Progesterone Receptor: PR) の発現や、細胞膜表面に存在して細胞の増殖や分化を調節する、受容体型チロシンキナーゼ活性を有するヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2: HER2) に対する感受性の有無がその成長や増殖へ関与することも知られている[7]。さらに女性の閉経後における脂肪細胞の肥大化に伴うエストロゲン合成の増加は、乳癌の危険因子として知られている[8]。

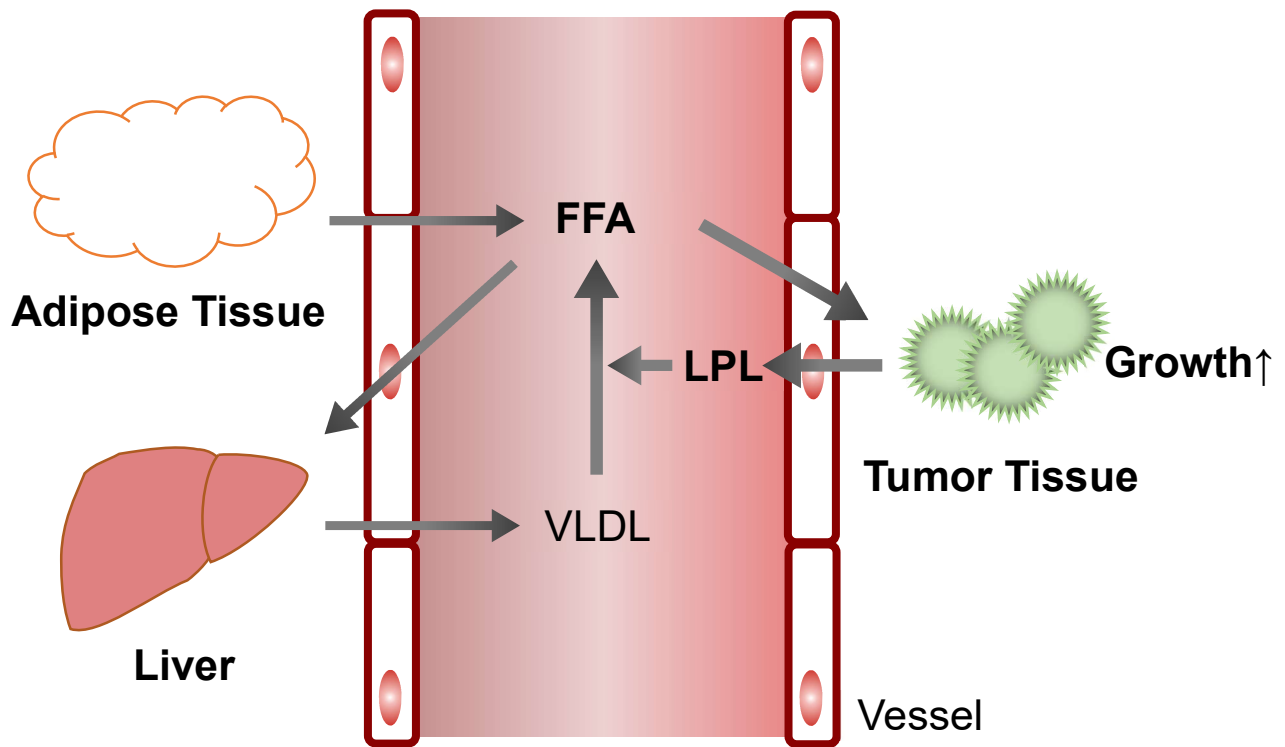
癌細胞は成長や増殖の際、栄養素を担癌宿主から奪取しているが、たとえ好气的状況下においても、ミトコンドリアでの代謝を抑え、嫌氣的解糖によるグルコース代謝を促進させるいわゆる Warburg 効果[9]によってその糖代謝効率の不良から、グルコース利用量が健常細胞よりも多くなっている。また宿主内でのグルコースとしての貯留量は栄養素全体の中では極めて少ないため、癌細胞の成長や増殖に必要なエネルギー源や細胞形成物質の確保に宿主内の脂肪の利用が必要と考えられる。さらに癌患者において血中総脂質量の著しい増加が認められることがある。その原因の一つとして、癌組織から分泌される TNF- $\alpha$  やインターロイキン-6 (Interleukin-6: IL-6) などの炎症性サイトカインにより担癌宿主の脂肪細胞におけるホルモン感受性リパーゼ (Hormone Sensitive Lipase: HSL) の活性上昇が惹起され、貯蔵されている脂肪の分解亢進及び分解の結果生じた脂肪酸やグリセロールの血中への分泌が増加し[10]、また、これらがトリガーとなり、肝臓での超低比重リポタンパク質 (Very Low Density Lipoprotein: VLDL) 合成が促進することが考えられている[11] (Fig. 1)。すなわち癌細胞による担癌宿主の脂質の利用を増加するため体脂肪が動員され、高脂血症や体脂肪の急激な枯渇が生じ、それによって宿主に癌性羸瘦が現れ、一方、癌細胞中への脂質の蓄積増加が生じ、ひいては癌治療への耐久力の虚弱化及び生活の質 (Quality of Life: QOL) の低下を伴う予後

不良が引き起こされる。すなわち、癌細胞の特性における脂質代謝のより一層の解明は、癌治療の診断や治療さらには予防や予後において極めて重要と考えられる。

ところで生体内の脂質代謝においてリポタンパク質リパーゼ (Lipoprotein Lipase : LPL) は肝臓以外の組織である筋肉、脂肪組織、乳腺などで合成後、細胞膜表面や血管内皮細胞上に分泌され、血中のカイロミクロン及びVLDL中のトリアシルグリセロール (Triacylglycerol : TG) を加水分解することで、各組織への脂肪酸及びリポタンパク質の供給を担う重要な脂質代謝酵素であり、本酵素の欠乏は重大な脂質異常症を呈する[12]。また LPL の活性は炎症性サイトカインにより抑制されることが知られることから、癌組織からの炎症性サイトカインの分泌によっても LPL の活性は抑制され、リポタンパク質からの脂肪酸の供給の低下やこれによる脂肪細胞の脂肪の貯蔵低下が生じる[13]。すなわち LPL の活性抑制は癌患者における高脂血症の一因となっている[14]。しかしながら、癌細胞において LPL は活発に合成・分泌されており、LPL を高発現している癌細胞を有する担癌体の予後は不良であることが示唆されている[15-18] (Fig. 1)。そのため、癌細胞の脂質代謝の内、LPL の挙動を解明することは、より重要であると考えられる。

LPL はその生成過程において、転写制御因子としてペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor : PPAR) や TNF- $\alpha$  など様々な因子が検討されている[13,19]。しかし、LPL の分泌機構についての詳細は未だ不明なことが多い。

そこで本研究では、近年発症率が増加傾向にあり問題視されている乳癌の細胞特性として脂質代謝の特性を検討するため、ホルモン受容体陽性乳癌細胞であるマウス乳癌 FM3A 細胞を用い、LPL の分泌機構について解析を進めた。すなわち第 1 章としてプロゲステロン及び第 2 章としてエストロゲンによる LPL 分泌に対する感受性発現機構について、中でも細胞内シグナル伝達系に着目し、それぞれ明らかにした。次いで第 3 章として細胞内シグナル伝達系の下流に存在し、細胞周期の制御を行っているサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin Dependent Kinase : CDK) に着目し、その阻害剤であるパルボシクリブを用いて細胞周期関連タンパク質と LPL 分泌機構との関与並びに脂質代謝の変動を解析した。



**Figure 1. Plasma lipids and tumor growth.**

FFA: Free Fatty Acid

LPL: Lipoprotein Lipase

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

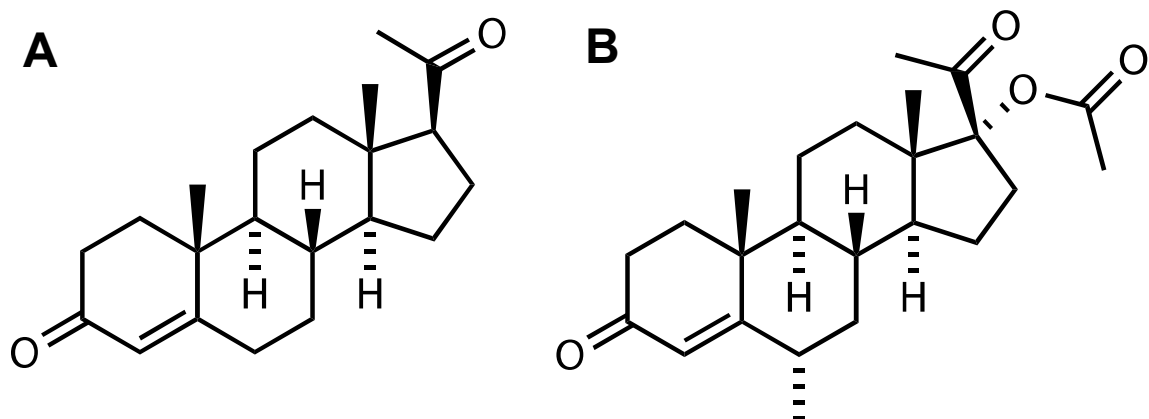
## 第1章 プロゲステロンによるマウス乳癌 FM3A 細胞からの LPL の分泌機構の解析

### 第1節 序論

プロゲステロン (Fig. 2A) は黄体ホルモンとも呼ばれ、卵巣や副腎などでコレステロールから合成されるステロイドホルモンであり、乳腺や子宮の発達及び排卵や妊娠などの生殖機能の維持に不可欠なホルモンである[20]。ところでステロイドホルモンの作用発現機構には大別して2つあり、遺伝子に作用し発現までに数時間必要な genomic effects と、作用発現まで数分間と早く細胞膜及び細胞質内に作用発現する non-genomic effects が存在する。プロゲステロンの2つの経路の内、genomic effects は細胞質内に存在する PR を介し、non-genomic effects は細胞膜上に存在する膜プロゲステロン受容体 (Membrane Progesterone Receptors : mPRs) (別称 : Progestin and AdipoQ Receptor) 及びプロゲステロン受容体膜構成要素 (Progesterone Receptor Membrane Component : PGRMC) を介し作用を発現している[21]。種々の乳癌細胞においてもそれらの受容体の発現は認められているが、プロゲステロンと乳癌との関連は未だ不詳であり、特に脂質代謝との関係はほとんど解明されていない。

合成プロゲステロンであるメドロキシプロゲステロン酢酸エステル (Medroxyprogesterone Acetate : MPA) (Fig. 2B) は、抗エストロゲン及び抗ゴナドトロピン作用を有し、我が国では、乳癌並びに子宮体癌 (内膜癌) の内分泌療法に 1980 年代以来用いられている。しかし、乳癌に対する抑制作用の詳細が検討段階であることや血栓症などの重要な副作用があることから、現在我が国では三次内分泌療法以降に使用されている[22]。しかし乳癌のみならず、多くの癌種において、担癌患者の癌性羸瘦に繋がる癌性食思不振に対し、改善作用が確認されており、海外では癌性食思不振に伴う悪液質症候群の治療薬としても承認されている[23-25]。また近年、内分泌療法の施行に伴うエストロゲン抵抗性発現などの観点から MPA の適応が再び注目され始めている[26,27]。そこで乳癌細胞に対するプロゲステロンの作用を明らかにするため、強力な黄体ホルモン作用を示す MPA を用いて癌細胞の増殖に重大な役割を担う脂質代謝について、特に脂質の供給を律速する LPL に着目し、その分泌段階について解析した。





**Figure 2. Structure of progesterone (A) and medroxyprogesterone acetate (B).**

## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬

MPA は和光純薬より購入した。H-89、U0126、FR180204、SB202190、SP600125、LY294002、KU0063794 及び Rapamycin は Cayman Chemical より購入した。各試薬はジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide : DMSO) に溶解し使用した。

### 第2項 細胞培養

使用したマウス乳癌 FM3A 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターから入手した。FM3A 細胞は 10% 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS)、0.2 mM アラニン、0.15 mM カナマイシン及び 2 mM グルタミンを添加した RPMI1640 培地を使用し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で増殖させた。

### 第3項 粗酵素標品作成

第2項で増殖させた FM3A 細胞を遠心分離 (150×*g*、3 分、4°C) し、細胞と上清に分離させた。上清を捨て 0.1% BSA 含有、ハンクス平衡塩溶液 (Hanks' Balanced Salt Solution : HBSS) で洗浄し、細胞密度を 1×10<sup>7</sup> 個/mL に調整した後、ディッシュに播種した。その後試薬を添加し、標記の時間培養した。培養後、細胞を回収し、遠心分離 (1,000×*g*、5 分、4°C) を行い、上清を LPL 粗酵素標品とし、細胞はホモジネートバッファー (25 mM HEPES[pH 7.2], 0.21 M マンニトール, 70 mM スクロース, 1 mM EGTA, 10 μM ロイペプチン, 1 mM β-グリセロリン酸及び 1 mM リン酸ナトリウム) を加え、超音波破碎機を用いて破碎し、遠心分離 (15,000×*g*、10 分、4°C) 後の上清を LPL、MAPK 粗酵素標品として、酵素活性測定及びウエスタンブロット法に使用した。

### 第4項 細胞増殖測定

FM3A 細胞を 10% FBS、0.2 mM アラニン、0.15 mM カナマイシン及び 2 mM グルタミンを添加した RPMI1640 培地に懸濁し、試薬を添加した後、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 72 時間増殖させた。細胞懸濁液に 0.2% トリパンブルーを混合し、生細胞数を Burkert-Turk 血球計算盤を用い測定した。

#### 第5項 LPL 酵素活性測定

LPL 酵素活性の測定には第3項で作成した LPL 粗酵素標品を用いた。LPL 酵素活性測定は Nilsson-Ehle ら[28]及び Belfrage ら[29]の方法を使用した。基質溶液の作成について、0.2 M Tris[37°C、pH 8.0]、0.3% BSA、0.07% Triton X-100 及び Triolein [carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]- (0.74  $\mu\text{M}$ ; 3.7 mBq/mL) (PerkinElmer) 49  $\mu\text{L}$  を氷中で、超音波処理 (3 分) して乳化処理し、さらに 12% BSA 20  $\mu\text{L}$ 、0.2 M Tris[37°C、pH 8.0] 21  $\mu\text{L}$  およびマウス非働化血清 10  $\mu\text{L}$  を加えたものを基質溶液とした。作成した基質溶液 0.1 mL に粗酵素標品 0.1 mL を添加し、37°C で 30 分間温置した。反応は反応停止液 (メタノール:クロロホルム:ヘプタン=1.41:1.25:1) 2 mL を添加して停止させたのち、0.1 M KOH を 0.65 mL 加え、10 分間振盪する。遊離脂肪酸 (Free Fatty Acid : FFA) を含むアルカリ-メタノール層 (上層) を 0.6 mL バイアルに採取し、リッキシンチ (National Diagnostics) 4 mL を加え、液体シンチレーションカウンター (アロカ製 LSC-6100) で FFA の放射活性を測定した。LPL の活性は 1M NaCl 存在下でほぼ完全に阻害されることから、1 M NaCl 存在下での LPL 粗酵素標品の値を用いて補正し、LPL 活性を nmol FFA/hr/ $10^6$  cells で表した。

#### 第6項 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 酵素活性測定

MAPK 酵素活性の測定には第3項で作成した MAPK 粗酵素標品を用いた。MAPK 酵素活性測定は Ferby ら[30]の方法に準じて測定した。基質溶液として 80 mM Tris [25°C、pH 7.5]、0.5 mg/mL myelin-basic protein、37 KBq[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (PerkinElmer)、0.2 mM ATP、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1 mM  $\text{MnCl}_2$  の混合液を使用した。MAPK 粗酵素標品 15  $\mu\text{L}$  に基質溶液 5  $\mu\text{L}$  を加え、25°C で 20 分間温置した。反応終了時に 0.1% BSA 含有 1 M HCl 3  $\mu\text{L}$  を加え反応を停止させた。反応液を円形濾紙 (Whatman P81 phosphocellulose paper) のうえに滴下し、0.5% リン酸溶液中で 1 時間振盪した後、0.5% リン酸溶液を入れ替え再び 1 時間振盪させた。その後、濾紙を風乾させ、リッキシンチを用いて液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。MAPK 活性は phosphorylated myelin pmol/min/ $10^6$  cells で表した。

#### 第7項 cAMP 含量測定

cAMP 含量の測定は第3項で作成した細胞標品、cAMP enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。cAMP 量は pmol/protein mg で表した。

#### 第8項 siRNA トランスフェクション

第2項で増殖させた FM3A 細胞を遠心分離 ( $150 \times g$ , 3 分,  $4^{\circ}\text{C}$ ) し、細胞と上清に分離させた。上清を捨て 10% FBS、0.2 mM アラニン及び 2 mM グルタミンを添加した RPMI1640 培地で懸濁し、細胞密度を  $8 \times 10^4$  個/mL に調整した。Rictor を標的とする siRNA (10 nM) (Sequence 5'-3': CACGAUUUCUAGCCAGUAA) 又は MISSION siRNA Universal Negative Control (Merck) を Opti-MEM (Gibco) 及び Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) と混合し、20 分間室温で反応させた。反応後、35 mm ディッシュまたは  $150 \text{ cm}^2$  細胞培養用フラスコ中で細胞懸濁液と混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で 48 時間培養した。ノックダウン効率は細胞内の目的タンパク質をウエスタンブロット法にて測定することで評価した。

#### 第9項 ウエスタンブロット法

第3項で作成した標品のタンパク質濃度は BCA protein assay を用いて測定した。標品をサンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% グリセロール、2% SDS、0.02% ブロモフェノールブルー、5% 2-メルカプトエタノール) に溶解し、 $95^{\circ}\text{C}$ 、5 分間加熱しタンパク質を変性させた。処理したタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離後、PVDF メンブレンに転写した。転写後、メンブレンを 1% スキムミルク含有 TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で 1 時間 blocking し、抗 LPL 抗体 (LabFrontier)、抗 Rictor 抗体 (Cell Signaling Technology) または抗  $\beta$ -アクチン抗体 (Proteintech) とともに、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ウサギ抗体 (Bio-Rad) またはマウス IgG 抗体 (Bethyl Laboratories) とともに 60 分間インキュベートし、イムノスター (和光純薬) を用いて発光させた。バンドの発行強度は CS アナライザー (Atto) で解析した。

#### 第10項 統計学的解析

結果は平均 $\pm$ 標準誤差 (SE) で示した。有意差検定は、2 群間の比較については Student's *t*-test、多群間の比較については一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後に Tukey 法または Dunnett 法を用いて行った。また、P 値が 0.05 未満を有意差ありとして解析した。

### 第3節 結果

#### マウス乳癌 FM3A 細胞における MPA による細胞増殖の変化

マウス乳癌細胞における MPA の感受性を確認するために、細胞懸濁液に MPA を添加し、72 時間培養した。その後、FM3A 細胞の増殖の変化を Burkert-Turk 血球計算盤を用いて計測した。細胞増殖は MPA 濃度 1 nM 及び 10 nM において有意に増加したが、高濃度の 20 nM 及び 50 nM では MPA 非存在下と比べ有意な増加が認められなかった (Fig. 3)。そこで今回の研究では、細胞増殖の増加が確認された MPA の濃度 (1 nM) を用いて LPL に対する検討を行った。

#### LPL 分泌に対する MPA の効果

FM3A 細胞に MPA を添加し、培養後の上清に含まれる LPL を分泌 LPL とした。LPL の活性をラジオエンザイムアッセイ、タンパク質量をウェスタンブロットを用いて測定した。1 nM の MPA では 90 分まで経時的に分泌 LPL 活性の有意な増加が認められた (Fig. 4A)。また、各濃度の MPA で 1 時間処理したところ、分泌 LPL の活性は 1 nM 及び 10 nM では有意に増加させたが、20 nM 以上では増加が認められなかった (Fig. 4C)。MPA による LPL 分泌量はウェスタンブロットによるタンパク質定量で変化が認められなかった (Fig. 4B, D)。

#### MPA による LPL 活性化に対する cAMP-Protein Kinase A (PKA) の関与

mPRs に対する MPA の作用を検討するため cAMP 含量の変化を ELISA 法を用いて測定した。cAMP 含量は MPA 添加後、30 秒から 180 秒の間で有意な増加が確認され、300 秒後では差が消失していた (Fig. 5)。cAMP は PKA を活性化することが知られている。そこで PKA の阻害剤である H-89[31]を使用し、MPA による LPL 活性化に対する PKA の関与を検討した。その結果、H-89 により MPA による LPL 活性化が抑制されることが認められた (Fig. 6)。

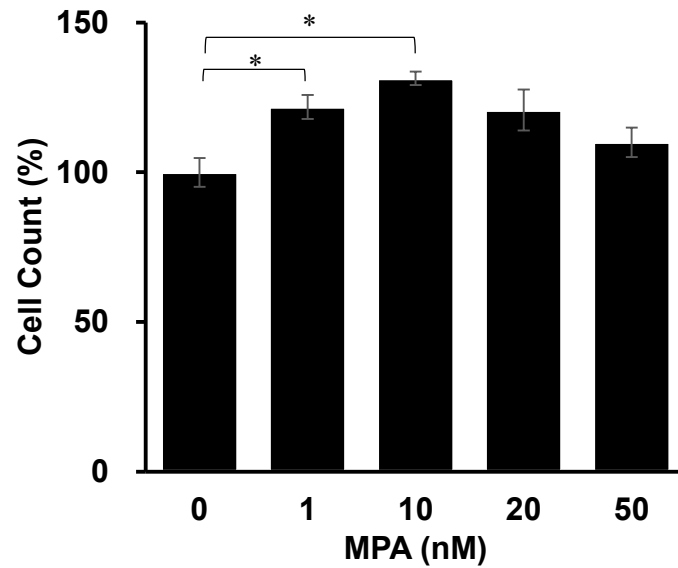
#### MPA による LPL 活性化に対する MAPK 経路の関与

MPA による膜受容体を介したシグナルが確認されたため、種々のシグナル伝達に関与している MAPK 経路の関与を検討した。FM3A 細胞における MPA による MAPK 活性の変化を、ラジオエンザイムアッセイを用いて測定した。その結果、MPA 処理後 20~60 分において

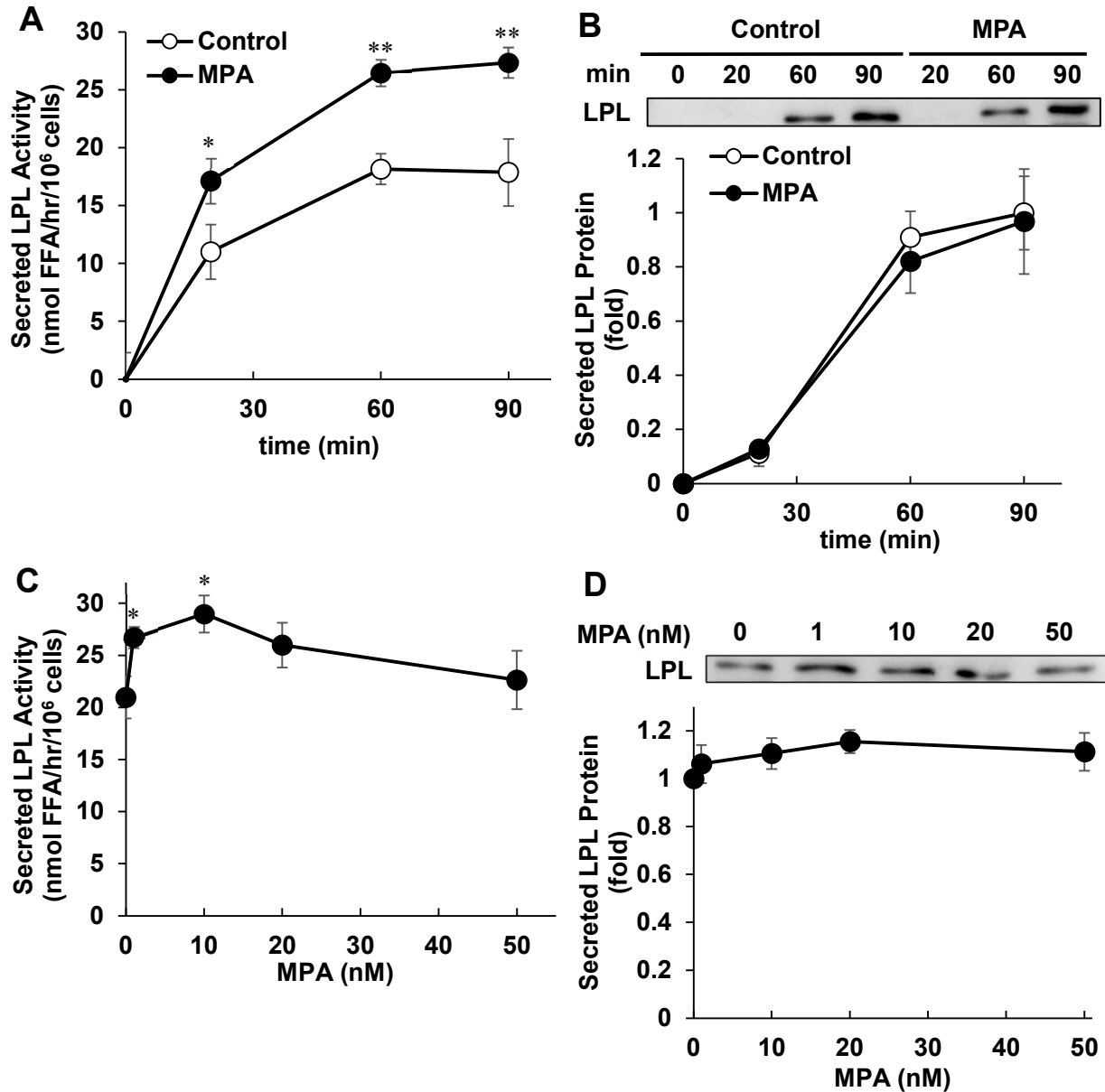
MAPK 活性の有意な上昇が認められた (Fig. 7)。MAPK 経路には、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 等のサブファミリーが知られている。そこで複数存在する MAPK のどの経路に LPL 活性化が依存しているのか確認するため、各経路の阻害剤を用いて解析した。阻害剤として、ERK の上流に存在する mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) に対し U0126[32]、ERK に対し FR180204[33]、p38 に対し SB202190[34]及び JNK に対し SP600125[35]を用いたところ、MEK、ERK、p38 の阻害剤によって MPA による LPL 活性化の有意な抑制が認められたが、JNK 阻害剤は効果を示さなかった (Fig. 8A-D)。また様々な細胞外シグナルの伝達に関わっている phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害剤 LY294002[36]を用いて検討したが、MPA による LPL の活性化は抑制されなかった (Fig. 9)。

#### **MPA による LPL の活性化に対する Mechanistic Target of Rapamycin Complex (mTORC) の関与**

mTOR は MAPK によって活性化され、癌細胞の増殖と密接に関与している[37]。そこで、MPA による LPL 活性化に対する mTOR の関与を検討した。mTOR は複数のタンパク質とともに 2 種類の複合体 (mTORC1 及び mTORC2) として存在している。そこで阻害剤として mTORC1/2 に対し KU0063794[38]、mTORC1 に対し Rapamycin[39]を用いて、MPA による分泌 LPL 活性を測定した。その結果、mTORC1/2 阻害剤である KU0063794 でのみ活性の阻害が確認された (Fig. 10A, B)。そこで、mTORC2 の関与を検討するため、mTORC2 の重要な構成タンパク質である Rictor[40]のノックダウンを行った。ノックダウンにより Rictor の発現量を低下させた細胞では MPA による分泌 LPL の活性化は認められなかった (Fig. 11A, B)。

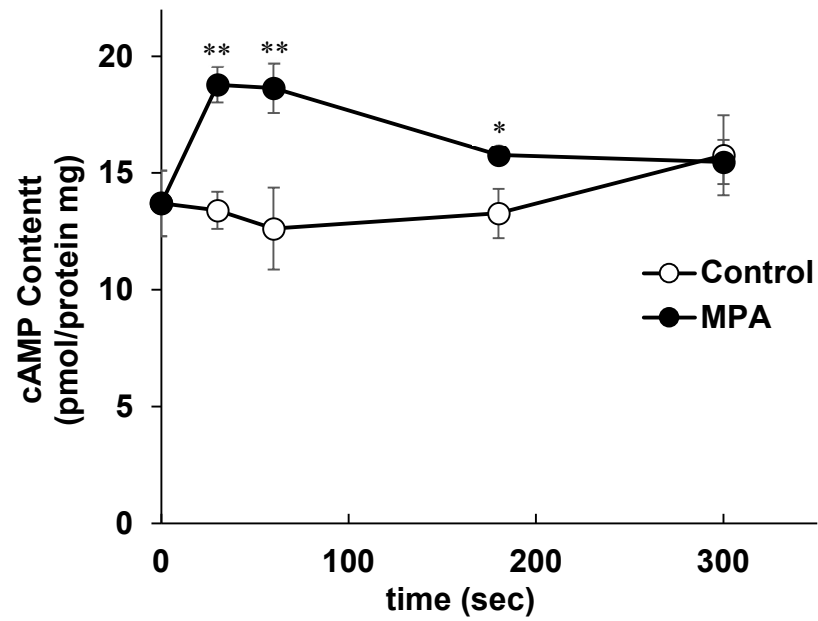


**Figure 3. Effects of MPA on the growth of mouse mammary tumor FM3A cells.** FM3A cell growth after treatment with various MPA concentrations for 72 hr. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05

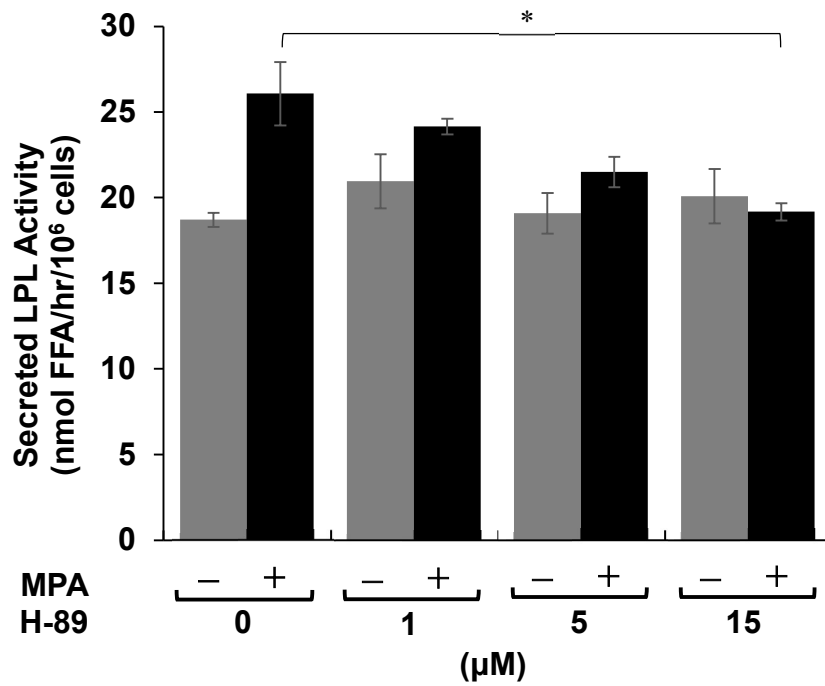


**Figure 4. Effects of MPA on secretion of LPL from mouse mammary tumor FM3A cells.** Secreted LPL and protein activity in FM3A cells incubated with (●) or without (○) 1 nM MPA for the indicated time (A, B). Changes in the secretion of LPL from the cells incubated for 60 min with various concentrations of MPA were examined (C, D). The activity of LPL (A, C) and LPL protein secreted (B, D) into the medium. Data were shown as mean ± SE. The data were analyzed by Student's *t*-test (A, B; compared to the control) or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (C, D; compared to the control). (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01

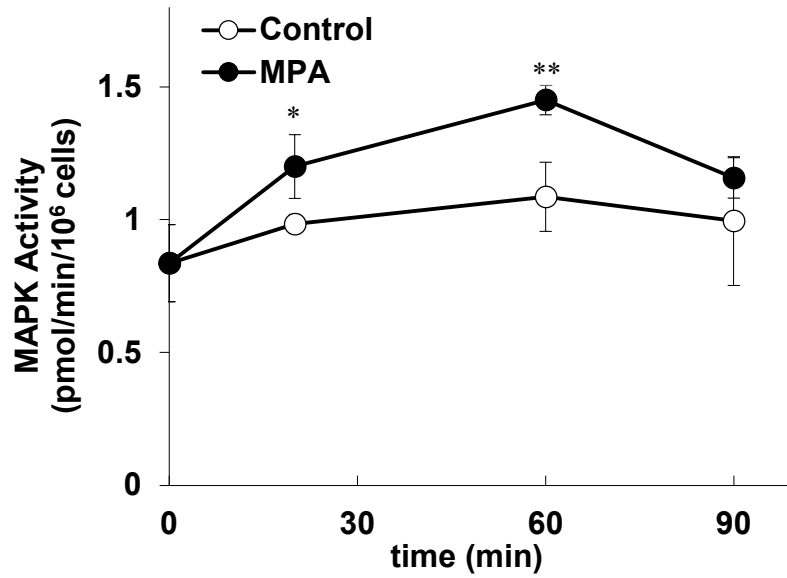




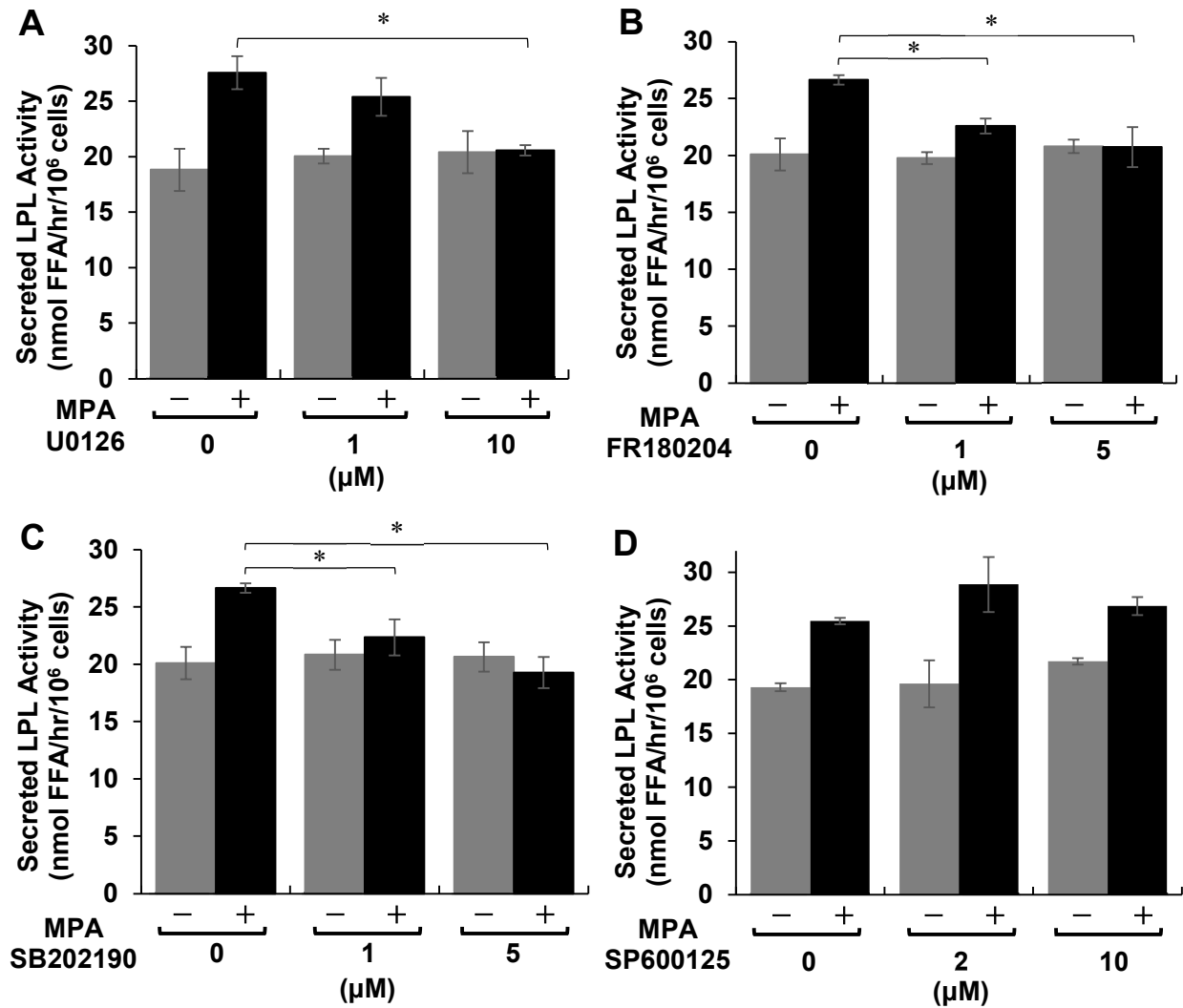
**Figure 5. Effect of MPA on cAMP contents in FM3A cells.** cAMP content in FM3A cells incubated with (●) or without (○) 1 nM MPA over 300 sec. Data were shown as mean  $\pm$  SE. Significant differences from the control group were determined by Student's *t*-test. (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01



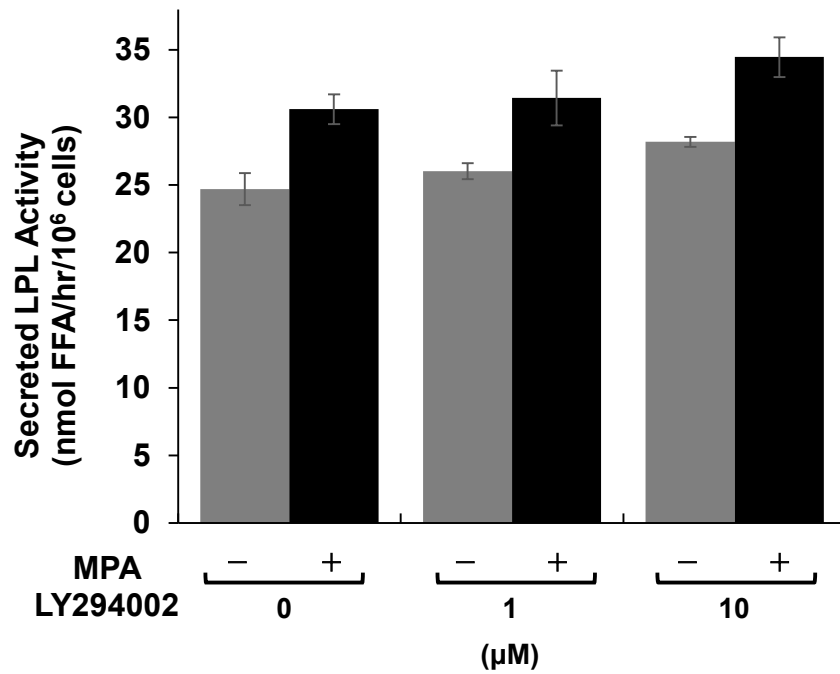
**Figure 6. Effect of PKA inhibitor on stimulatory secretion of LPL by MPA.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 1 nM MPA under the pretreatment of H-89 for 20 min. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=4) \*P < 0.05



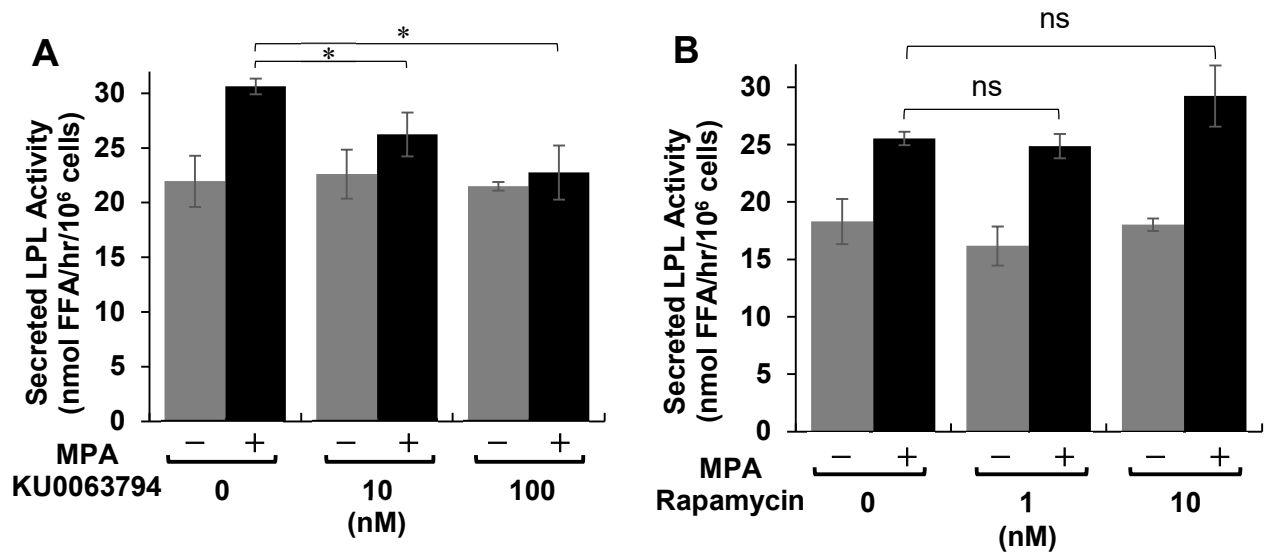
**Figure 7. Effect of MPA on intracellular MAPK activity.** MAPK activity in FM3A cells incubated with (●) or without (○) 1 nM MPA over a 90-min period. Data were shown as mean  $\pm$  SE. Significant differences from the control group were determined by Student's *t*-test. (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01



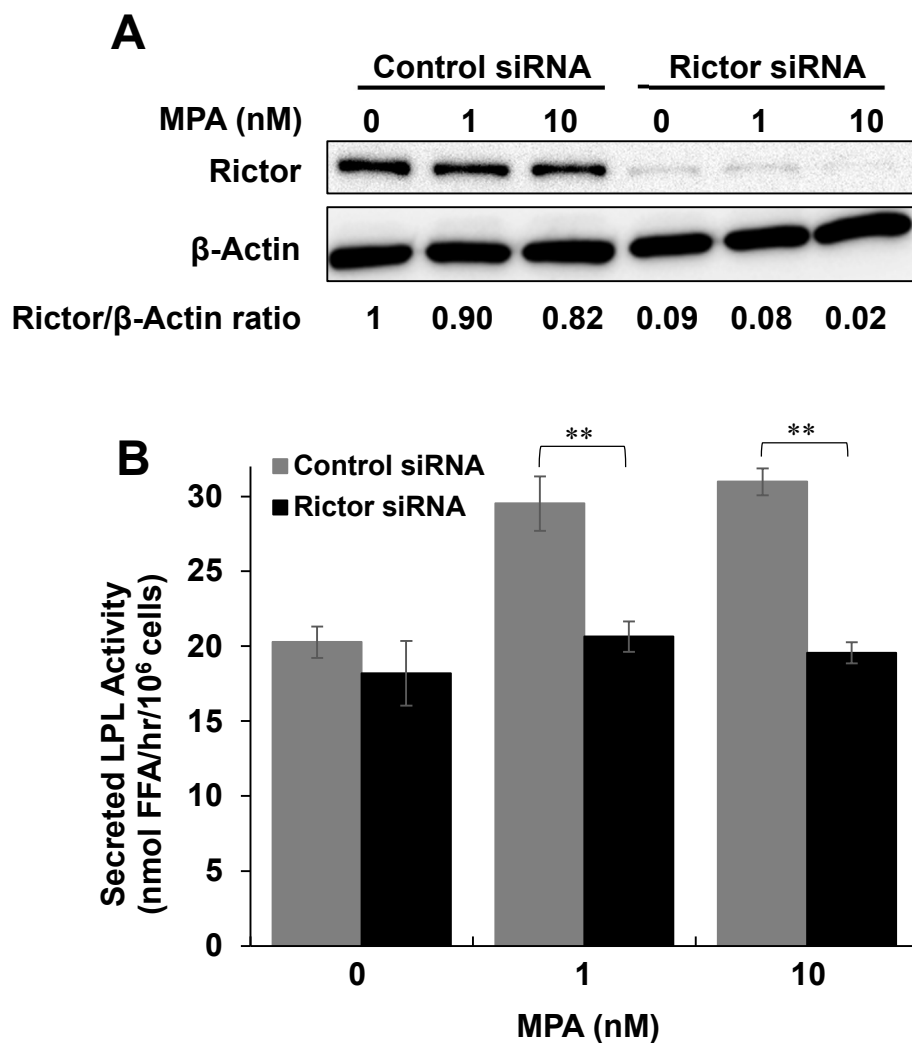
**Figure 8. Effect of MAPK inhibitors on stimulatory secretion of LPL by MPA.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 1 nM MPA under the pretreatment of U0126 (A), FR180204 (B), SB202190 (C), and SP600125 (D) for 20 min. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05



**Figure 9. Effect of PI3K inhibitor on stimulatory secretion of LPL by MPA.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 1 nM MPA under the pretreatment of LY294002 for 20 min. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA. (n=6)



**Figure 10. Effects of mTOR inhibitors on stimulated secretion of LPL by MPA.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 1 nM MPA under the pretreatment of KU0063794 (A) and rapamycin (B) for 20 min. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05, not significant (ns; P > 0.05)



**Figure 11. Effects of Rictor knockdown on MPA-stimulated secretion of LPL.** FM3A cells were transfected with Rictor siRNA and control siRNA. Rictor knockdown efficiency was determined by western blot. Rictor/ $\beta$ -Actin ratio means fold change of Rictor to  $\beta$ -actin ratio normalized to control siRNA (A). Secreted LPL activity in transfected FM3A cells incubated for 60 min with MPA (B). Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by Student's *t*-test. (n=4) \*\*P < 0.01

## 第4節 考察

高用量 MPA には癌細胞の増殖抑制作用が認められており、そのため乳癌内分泌療法として使用されることがある。しかしながら低濃度 MPA では乳癌細胞の増殖が促進されとの報告がある[41,42]。今回の研究では、閉経前非妊娠女性の血中プロゲステロン濃度は最大約 100 nM とされているため、50 nM までの濃度で検討した。今回使用したマウス乳癌 FM3A 細胞では MPA 濃度が 10 nM まで細胞増殖及び LPL 活性化が促進し、20 nM 以上では両変化は認められなかった (Fig. 3)。これらのことから、MPA は濃度により異なる作用を示していることを示唆している。そして MPA による LPL 活性化が 20 分以内に生じた (Fig. 4A) ことから、この反応は non-genomic effects に依存していると考えられる。

mPRs は細胞膜上に存在し、その構造は G タンパク質共役型受容体と判明しているが、サブタイプの詳細は不明である。そこで MPA による細胞内 cAMP 量の変化を測定したところ、3 分間まで有意に cAMP 含量が増加した (Fig. 5)。そのため FM3A 細胞における mPRs は Gs タンパク質共役型受容体であることが考えられる。ごく短時間の cAMP 含量増加による PKA の活性化は報告されており[43]、PKA の阻害剤 (H-89) によって MPA による LPL 活性化が有意に抑制された (Fig. 6) ことから mPRs を介した cAMP は LPL 活性化に関与していることが示唆された。

MAPK 経路は様々な細胞外シグナルを核内へ伝達する役割を担う重要な経路である。この経路は ERK 経路、p38 経路、JNK 経路などが存在しているとされており、それぞれが細胞外シグナルの伝達経路を担っている。その中でも ERK 経路は癌細胞の増殖に極めて重要な役割をしており、治療のターゲットとしても注目されている[44]。プロゲステロンは 1 時間以内に MAPK 経路の複数のタンパク質をリン酸化させることが知られている[42,45,46]。FM3A 細胞においても MPA による 1 時間以内での MAPK 活性の上昇が認められた (Fig. 7)。また U0126 及び FR180204 並びに SB202190 によって MPA による LPL 活性化が抑制された (Fig. 8A-C) ことから、ERK1/2 及び p38 経路が活性化に関与していることが示された。

mTOR は細胞の増殖及び代謝の調節を行うセリン/スレオニンキナーゼであり、mTORC1 と mTORC2 の 2 種類の複合体として存在している。複合体はそれぞれ制御機構が異なっていることが知られており、mTORC1 はホルモンやアミノ酸などの栄養素による細胞外シグナルをアデノシン一リン酸活性化タンパク質キナーゼ (AMP-Activated Protein Kinase: AMPK)、セリン/スレオニンキナーゼ AKT (AKT) (別称: プロテインキナーゼ B) 及び ERK などの



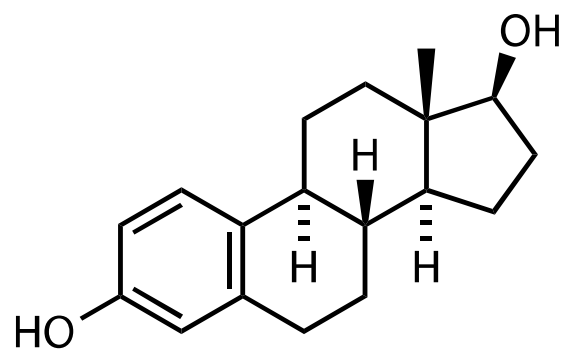
細胞内シグナル伝達系を介した制御をうけており[47-49]、主にタンパク質の合成や分解に関与していることが知られている[50-52]。一方で mTORC2 の制御メカニズムはあまり知られておらず、PI3K や結節性硬化症 (Tuberous Sclerosis Complex ; TSC) によって制御されることが報告されている[53]がその詳細は明らかではない。作用についてもアクチンの重合を調節する因子であるとの報告がある[54]。しかしながらその他の作用についてはほとんど明らかにされていない。本研究において MPA による LPL 活性化が mTORC1 阻害剤では抑制されなかった (Fig. 10B) のに対し、Rictor の発現量を低下させた細胞では活性化が抑制された (Fig. 11A, B) ことから、mTORC2 に特異的な LPL 活性化に繋がるタンパク質の翻訳後修飾が存在する可能性が示唆された。

## 第2章 エストロゲンによる LPL 活性化機構の解析

### 第1節 序論

エストロゲンは卵胞ホルモンとも呼ばれ、組織の成長・分化及び機能の制御を行う主要なステロイドホルモンであり、卵巣や脂肪組織において、プロゲステロンから生合成される。エストロゲンには三種類存在しており、その中でも  $17\beta$ -エストラジオール ( $17\beta$ -Estradiol : E2) (Fig. 12) は最も主要で強力な作用を示すホルモンである。その作用は、乳腺細胞の増殖促進、卵巣排卵制御があり、さらに性ホルモン以外の作用として糖代謝や骨代謝さらに脂質代謝において LDL の減少や VLDL 及び高比重リポタンパク質 (High Density Lipoprotein : HDL) を増加させることが知られている[55-59]。エストロゲンの作用機序として genomic effects と non-genomic effects が存在している。Genomic effects は細胞質内もしくは核内に存在する ER と結合後、二量体を形成した ER がホルモン応答エレメントのエストロゲン受容体エレメントと結合し、遺伝子のホルモン応答配列に結合し、転写活性を調節する[60,61]。一方、non-genomic effects は細胞膜上に存在する G タンパク質共役型エストロゲン受容体 (G Protein-Coupled Estrogen Receptor : GPER) (旧名称 : GPR30) に結合し、MAPK などの細胞内シグナル伝達系を活性化することでエストロゲンの作用を発現している[62,63]。このようにエストロゲンは様々な組織において重要な働きをしている。さらに癌細胞との関連も知られている。

乳癌においては、エストロゲンやプロゲステロン受容体の発現が多いタイプ、いわゆるホルモン受容体陽性乳癌が多い。そこでその増殖がエストロゲンに強く依存している乳がん患者に対しては、ER を標的とした内分泌療法を施行し、そのため抗エストロゲン製剤の投与が施行されている。また前述のようにエストロゲンは細胞の性ホルモン以外の代謝にも大きく関与しており、グルコース代謝、アミノ酸代謝[64]、脂質代謝等の調節を行っていることから抗エストロゲン剤のホルモン受容体陽性乳癌患者に対する有用性が確認されている。しかしながら乳癌細胞自身の増殖や成長にとって必須の栄養素である脂質の供給についてのエストロゲンの作用の詳細は不明である。そこで本章では乳癌細胞に対するエストロゲンの脂質代謝に対する作用をより明らかにするため、脂質の供給において重要な役割を担うリポタンパク質代謝について特に E2 による LPL 分泌機構に着目して解析した。



**Figure 12. Structure of 17β-estradiol.**

## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬

試薬は、本論第1章の第2節、第1項に示したものに加え、E2 は和光純薬、PD98059 は Cayman Chemical より購入した。各試薬は DMSO に溶解し使用した。

### 第2項 細胞培養

細胞培養の方法は、本論第1章の第2節、第2項に示した。

### 第3項 粗酵素標品作成

粗酵素標品作成方法は、本論第1章の第2節、第3項に示した。

### 第4項 細胞増殖測定

細胞増殖測定方法は、本論第1章の第2節、第4項に示した。

### 第5項 LPL 酵素活性測定

LPL 酵素活性測定は、本論第1章の第2節、第5項に示した

### 第6項 MAPK 酵素活性測定

MAPK 酵素活性測定は、本論第1章の第2節、第6項に示した。

### 第7項 cAMP 含量測定

cyclic AMP 含量測定は、本論第1章の第2節、第7項に示した。

### 第8項 siRNA トランスフェクション

siRNA トランスフェクションは、本論第1章の第2節、第8項に示した。

### 第9項 ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は、本論第1章の第2節、第9項に示した。

## 第 10 項 統計学的解析

結果は平均±標準誤差 (SE) で示した。有意差検定は、2 群間の比較については Student's *t*-test、多群間の比較については one-way ANOVA 後に Dunnett 法を用いて行った。また、P 値が 0.05 未満を有意差ありとして解析した。

### 第3節 結果

#### マウス乳癌 FM3A 細胞における E2 による細胞増殖の変化

マウス乳癌細胞における E2 の感受性を確認するために、細胞懸濁液に E2 を添加し、72 時間培養した。その後、FM3A 細胞の増殖の変化を Burker-Turk 血球計算盤を用いて計測した。細胞増殖は E2 濃度依存的に増加し、1 nM 及び 10 nM で有意な増加が認められた (Fig. 13)。閉経前非妊娠女性の血中 E2 濃度は最大約 2 nM とされているが、今回の研究では FM3A 細胞の増殖が 10 nM まで濃度依存的に増加したことから、より有意差の確認できる 10 nM までの濃度で検討した。

#### LPL 分泌に対する E2 の効果

FM3A 細胞に E2 を添加し、培養後の上清に含まれる LPL を分泌 LPL とした。LPL の活性をラジオエンザイムアッセイ、タンパク質量をウェスタンブロットを用いて測定した。E2 濃度 10 nM では 90 分まで経時的に分泌 LPL 活性の有意な増加が認められた (Fig. 14A)。また、各濃度の E2 で 1 時間処理したところ、分泌 LPL の活性は 1 nM 及び 10 nM で有意な増加が確認された (Fig. 14C)。E2 による LPL 分泌量はウェスタンブロットによるタンパク質定量で変化が認められなかった (Fig. 14B, D)。

#### E2 による LPL 活性化に対する cAMP-PKA の関与

細胞膜に存在する GPER に対する E2 の作用を検討するため cAMP 含量の変化を ELISA 法を用いて測定した。FM3A 細胞内 cAMP 含量は E2 添加後 30 秒において有意に増加することが確認された (Fig. 15)。cAMP によって活性化されることが知られている PKA の阻害剤である H-89 を使用し、E2 による LPL 活性化に対する PKA の関与を検討した。その結果、H-89 により E2 による LPL 活性化が抑制されることが確認された (Fig. 16)。

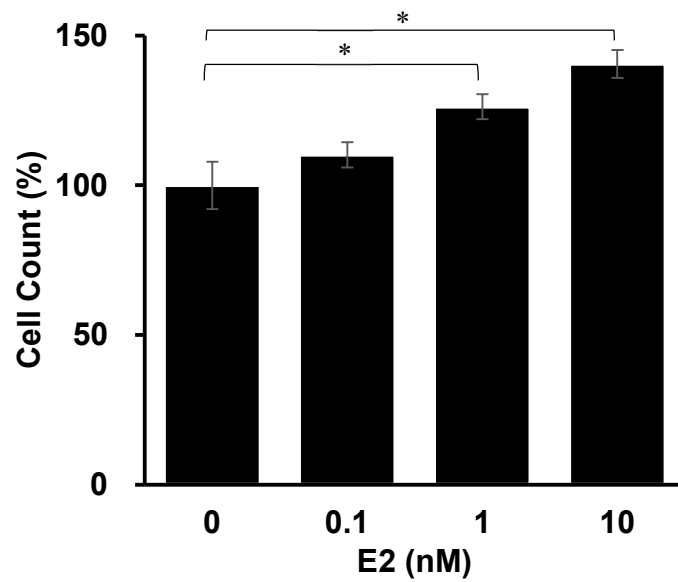
#### E2 による LPL 活性化に対する MAPK 経路及び PI3K の関与

E2 による膜受容体を介したシグナルが確認されたため、種々のシグナル伝達に関与している MAPK 経路の関与を検討した。FM3A 細胞における E2 による MAPK 活性の変化を、ラジオエンザイムアッセイを用いて測定した。その結果、E2 処理後 60 分及び 90 分で MAPK 活性の有意な上昇が認められた (Fig. 17)。続いて複数存在する MAPK のどの経路が E2 に

よる LPL 活性化に関与しているのか確認するため、各経路の阻害剤を用いて解析した。阻害剤として PD98059 (MEK 阻害剤)、FR180204 (ERK 阻害剤)、SB202190 (p38 阻害剤) 及び SP600125 (JNK 阻害剤) を用いたところ、MEK、ERK、p38 の阻害剤によって E2 による LPL 活性化の有意な抑制が認められた (Fig. 18A-D)。また様々な細胞外シグナルの伝達に関わっている PI3K の阻害剤 LY294002 によっても、E2 による LPL の活性化が有意に抑制された (Fig. 19)。

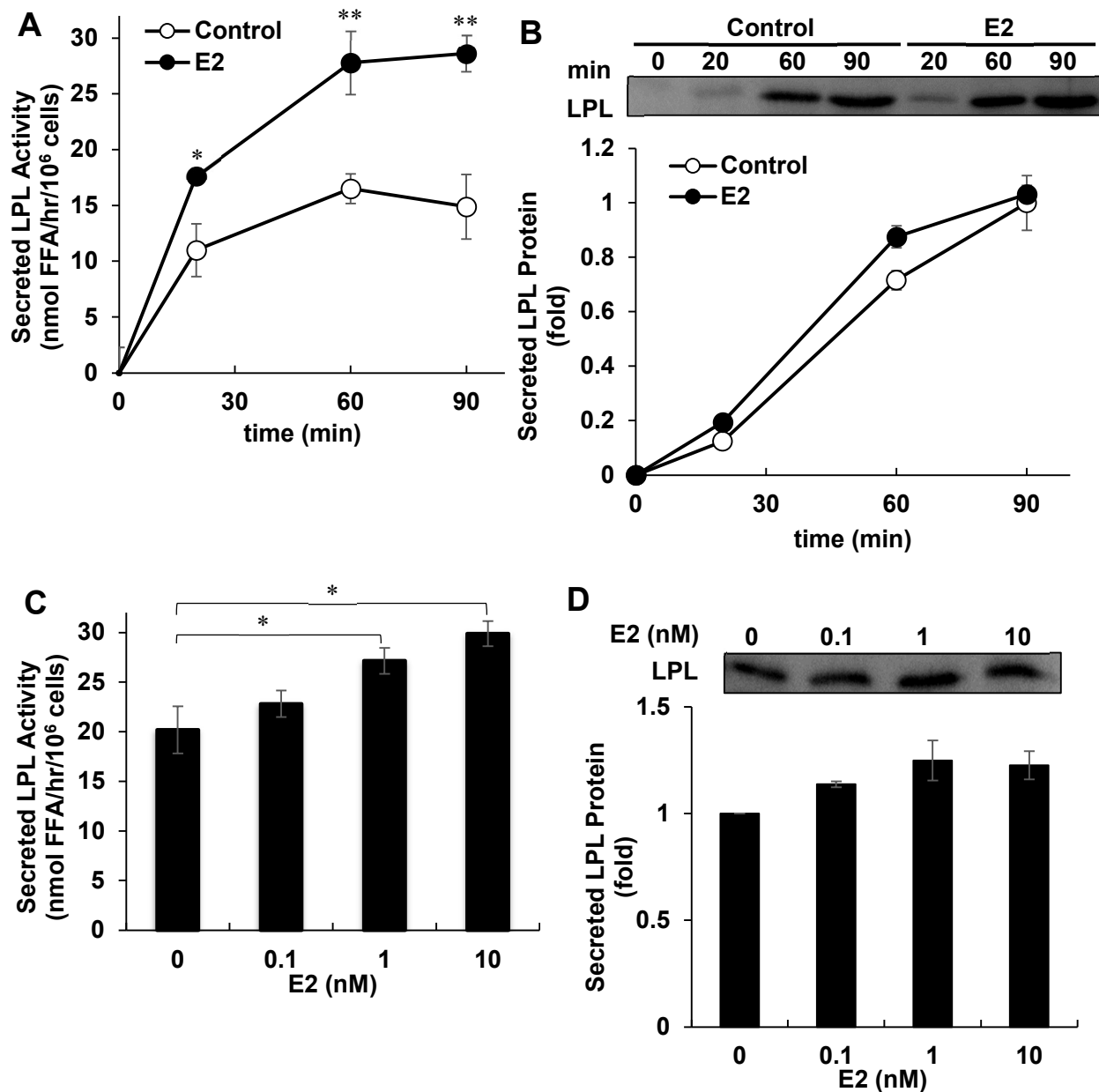
### **E2 による LPL の活性化に対する mTOR の関与**

さらなる E2 による LPL 活性化機構の解析を行うため、MAPK によって活性化され癌細胞の増殖と密接に関係している mTOR の関与を検討した。mTOR は複数のタンパク質とともに 2 種類の複合体として存在しているため、阻害剤として KU0063794 (mTORC1/2 阻害剤) 及び Rapamycin (mTORC1 阻害剤) を用いて、E2 による分泌 LPL 活性を測定したところ、mTORC1/2 阻害剤である KU0063794 でのみ活性の阻害が確認された (Fig. 20A, B)。そこで、mTORC2 の関与を検討するため、mTORC2 の重要な構成タンパク質である Rictor のノックダウンを行った。ノックダウンにより Rictor の発現量を低下させた細胞では E2 による分泌 LPL の活性化は認められなかった (Fig. 21A, B)。

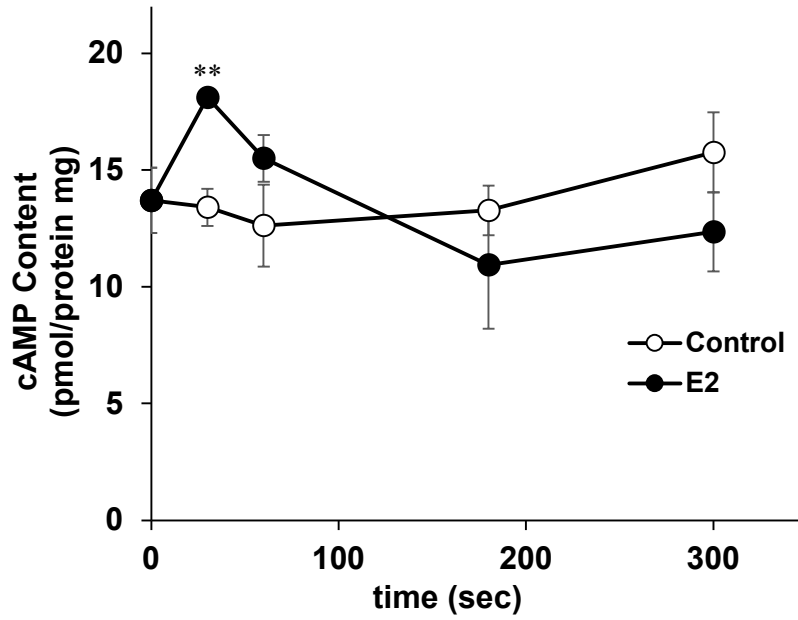


**Figure 13. Effects of E2 on the growth of mouse mammary tumor FM3A cells.** FM3A cell growth after treatment with various E2 concentrations for 72 hr. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05

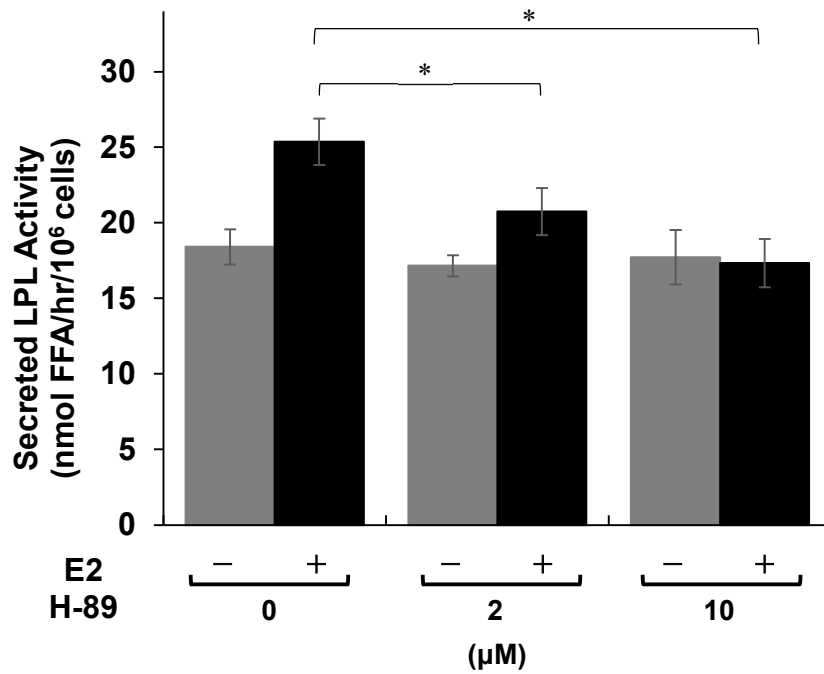




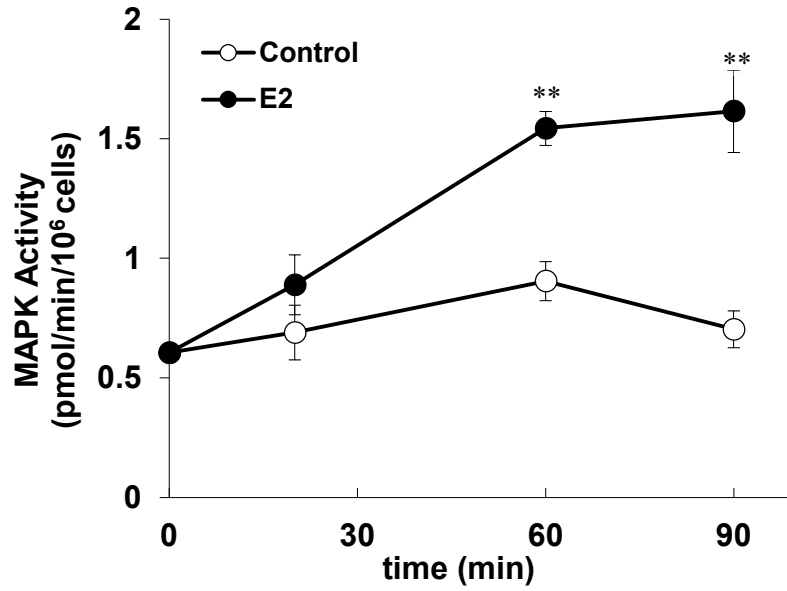
**Figure 14. Stimulatory effects of E2 on secretion of LPL activity from mouse mammary tumor FM3A cells.** FM3A cells were treated with (●) 10 nM E2 or without (○) for indicated time (A, B). Changes on secretion of LPL the cells incubated for 60 min with various concentrations of E2 (C, D). The activity (A, C) and protein (B, D) of LPL secreted into the medium was measured by radio enzyme assay. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by Student's *t*-test (A, B; compared to the control) or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (C, D; compared to the control). (n=6) \*P < 0.05



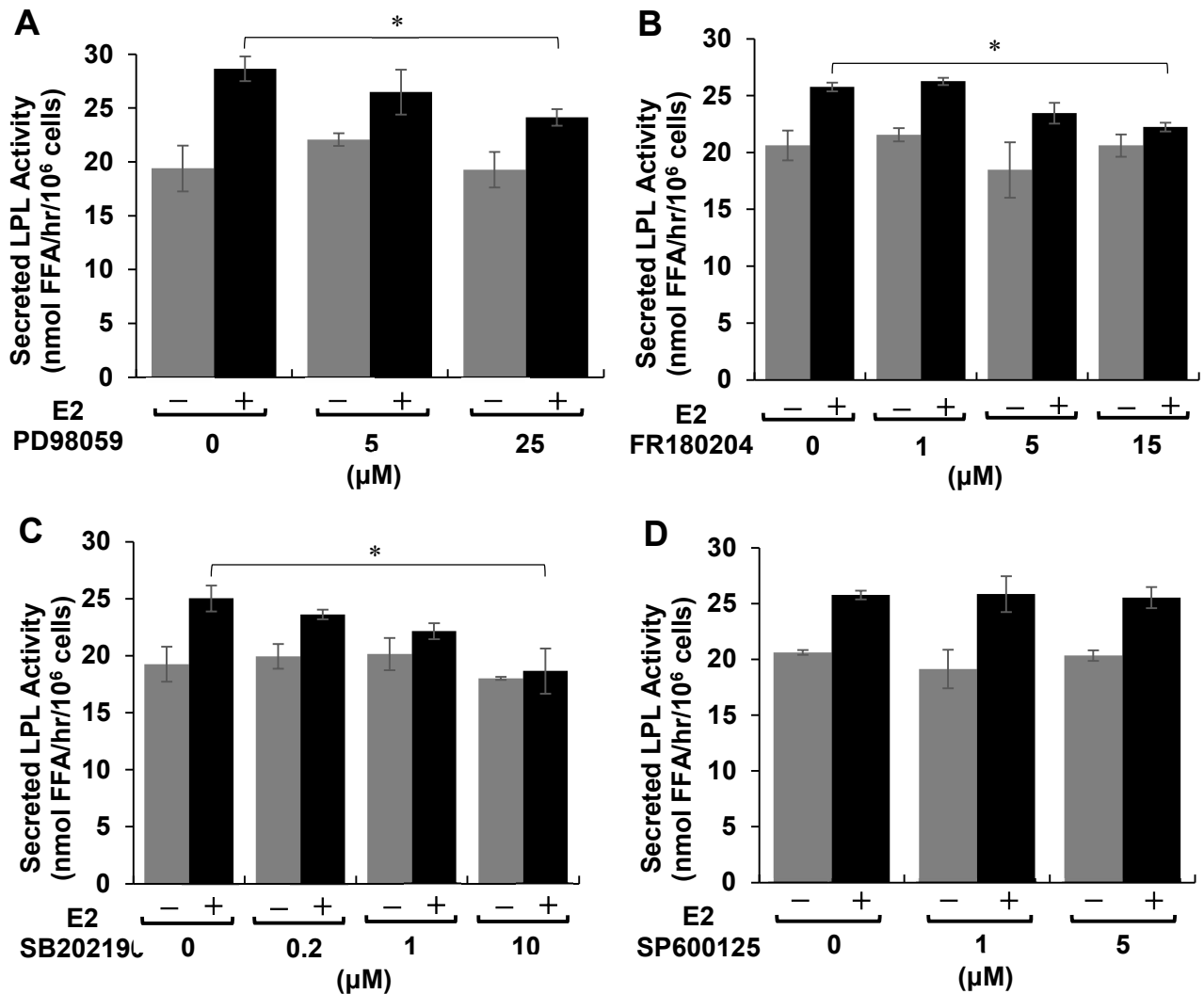
**Figure 15. Effect of E2 on cAMP contents in FM3A cells.** cAMP content in FM3A cells incubated with (●) or without (○) 10 nM E2 over 300 sec. Data were shown as mean  $\pm$  SE. Significant differences from the control group were determined by Student's *t*-test. (n=6) \*\*P < 0.01



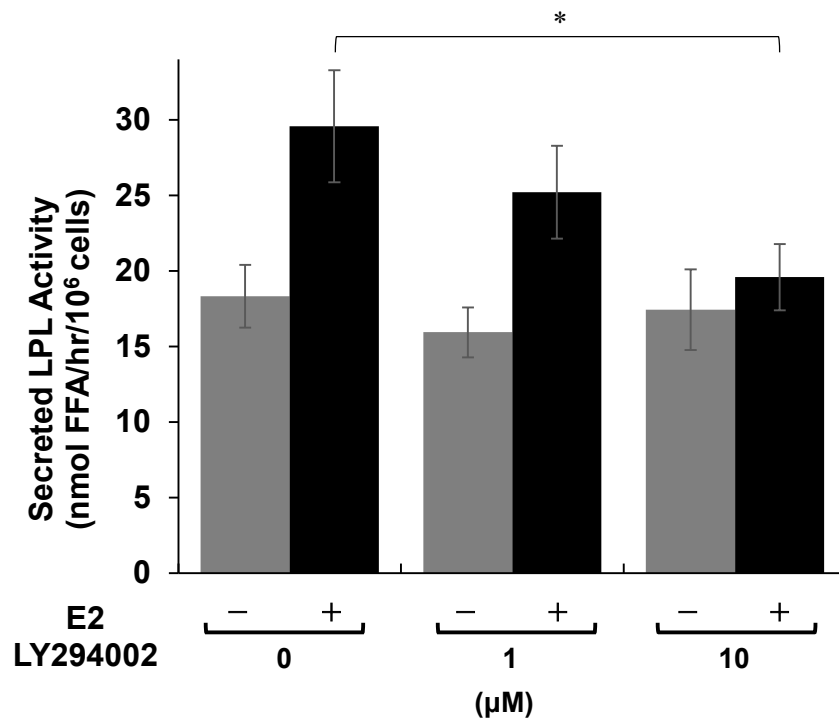
**Figure 16. Effect of PKA inhibitor on stimulatory secretion of LPL by E2.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 10 nM E2 under the pretreatment of H-89 for 20 min. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=4) \*P < 0.05



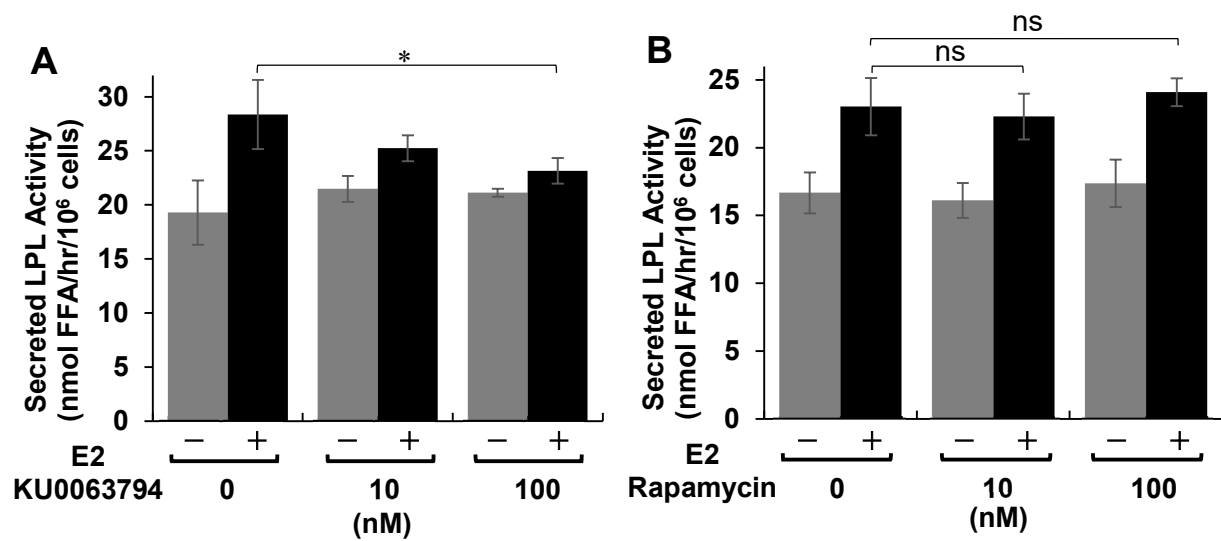
**Figure 17. Effects of E2 on MAPK activity in FM3A cells.** FM3A cells were incubated with (●) 10 nM E2 or without (○) over 90-min period. MAPK activity was measured by radio enzyme assay. Data were shown as mean  $\pm$  SE. Significant differences from the control group were determined by Student's *t*-test. (n=6) \*\*P < 0.01



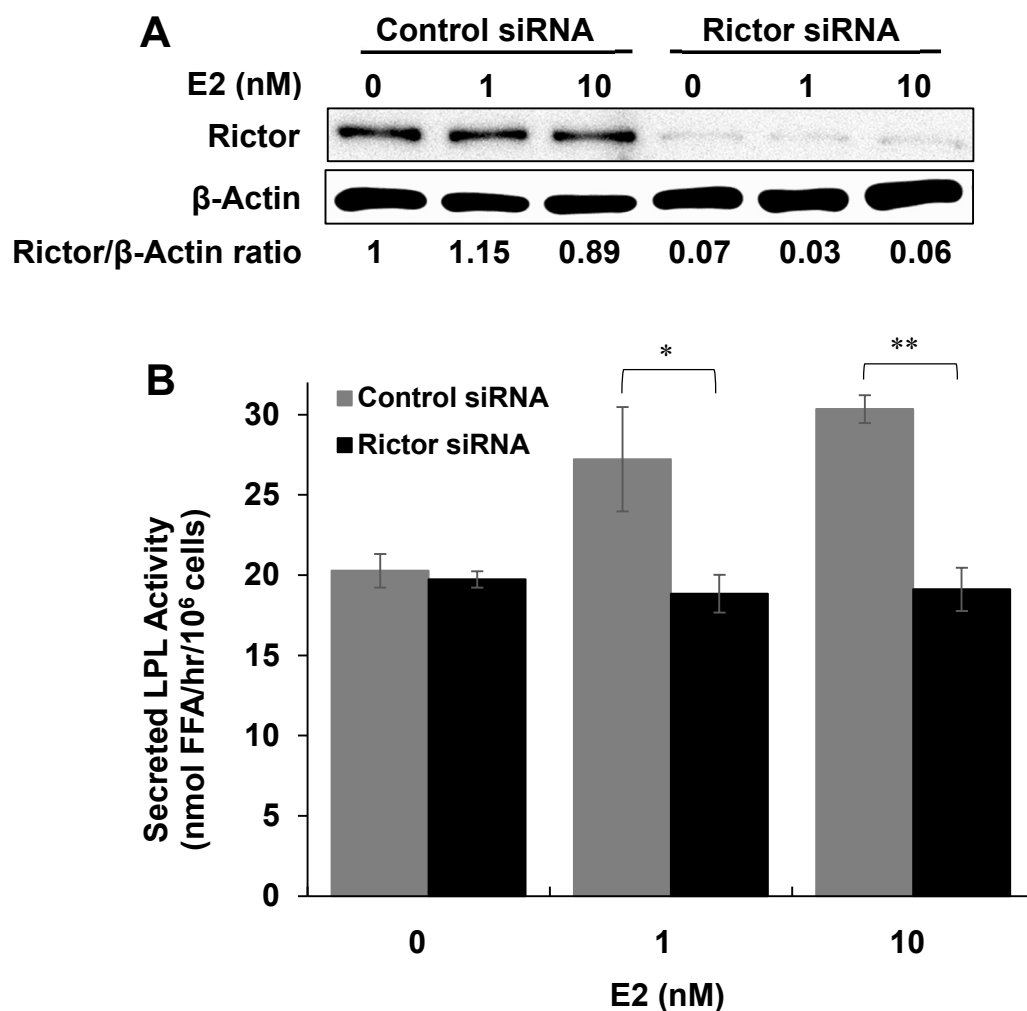
**Figure 18. Effects of MAPK inhibitor on stimulatory secretion of LPL by E2.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 10 nM E2 under the pretreatment of PD98059 (A), FR180204 (B), SB202190 (C), and SP600125 (D) for 20 min. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05



**Figure 19. Effects of PI3K inhibitors on stimulatory secretion of LPL by E2.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 10 nM E2 under the pretreatment of LY294002 for 20 min. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05



**Figure 20. Effects of mTOR inhibitors on stimulatory secretion of LPL by E2.** Secreted LPL activity in FM3A cells incubated for 60 min with or without 10 nM E2 under the pretreatment of KU0063794 (A) and rapamycin (B) for 20 min. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05 not significant (ns; P > 0.05)



**Figure 21. Effects of Rictor knock-down on stimulatory secretion of LPL by E2.** FM3A cells were transfected with Rictor siRNA and control siRNA. Rictor knockdown efficiency was determined by western blot. Rictor/ $\beta$ -Actin ratio means fold change of Rictor to  $\beta$ -actin ratio normalized to control siRNA (A). Secreted LPL activity in transfected FM3A cells incubated for 60 min with E2 (B). Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by Student's *t*-test. (n=4) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01



## 第4節 考察

E2 と LPL の関係は複数報告されているが、臓器により反応が異なり、さらに乳癌細胞における LPL との関係についての解析はほとんど行われていない[65-67]。そこで E2 の脂質代謝へのさらなる調査を行うため、LPL の分泌機構に対する影響の検討を行った。今回使用したマウス乳癌 FM3A 細胞では E2 濃度が 10 nM まで LPL 活性化が促進した (Fig. 14C)。そして 20 分以内で E2 による LPL 活性化が生じた (Fig. 14A) ことから、この反応は non-genomic effects に依存していると考えられる。

GPER は細胞膜上に存在するエストロゲン受容体であり、その構造は G タンパク質共役型受容体だと示唆されており、アデニル酸シクラーゼ (Adenylate Cyclase : AC) や MAPK など数多くのシグナル伝達に関与しているとの報告がある[68,69]。そこで E2 による細胞内 cAMP 量の変化を測定したところ、1 分間の短時間で cAMP 含量が増加した (Fig. 15)。この cAMP 含量増加による PKA の活性化と LPL の活性化との関係を検討したところ、PKA の阻害剤 (H-89) によって E2 による LPL 活性化が有意に抑制された (Fig. 16)。このことから、GPER を介した cAMP 増加は LPL 活性化に関与していることが示唆された。

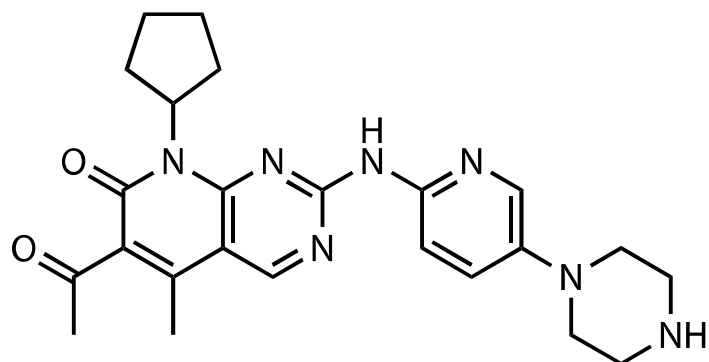
MAPK はエストロゲンにより活性化されることが知られている[69,70]。今回用いた FM3A 細胞においても活性化が確認された (Fig. 17)。MAPK には複数の経路が存在するが、エストロゲンによる各経路の活性化とその後の反応の解析は未だ不十分である。本研究において E2 による LPL の活性化においては ERK 及び p38 の経路が関与していることが示された (Fig. 18A-C)。また E2 による LPL 活性化には PI3K の関与も示され、MPA による LPL 活性化機序との相違も見られた (Fig. 19)。

エストロゲンによる mTORC1 の活性化は乳癌細胞の増殖に重要な役割をしているとの報告が数多く存在する[71]。近年 mTORC2 との関係もいくつか報告されているが、その役割は明らかではない。本研究において E2 による LPL 活性化が mTORC1/2 阻害剤及び Rictor のノックダウンによって抑制された (Fig. 20A) (Fig. 21A, B) ことから、E2 においても mTORC2 を介して LPL 活性化が行われていることが示唆された。

### 第3章 細胞周期に対する分子標的薬による脂質代謝の変動に関する解析

#### 第1節 序論

ホルモン受容体陽性乳癌の治療はエストロゲン受容体を標的とした内分泌療法が一般的である[72]。しかしホルモン受容体陽性でありながら内分泌療法に抵抗性を有する乳癌も存在する。内分泌療法抵抗性のメカニズムとして、PI3K/AKT/mTOR経路の活性化が報告されており[73]、mTORを標的とした治療薬（エベロリムス）などが使用されている。さらに近年では特にサイクリン D1 の過剰発現が内分泌療法抵抗性及び予後悪化の因子として重要な報告がなされている[74]。そのため次の治療として着目されたのが CDK である。CDK は、セリン/スレオニンキナーゼであり、サイクリンと相互作用することで細胞周期の進行を制御する重要なタンパク質である。細胞周期は、G0/G1→S→G2 の間期、さらに M 期（有糸分裂と細胞分裂）に分けられ、それぞれのチェックポイントにおいてサイクリン/CDK 複合体による制御機構が存在している[75]。中でも CDK4 及び CDK6 はサイクリン D1 と複合体を形成することで網膜芽細胞腫（Retinoblastoma : Rb）タンパク質をリン酸化し、Rb に結合している E2F が遊離し転写領域に結合することで転写が制御され S 期への移行を促進させる。このサイクリン D1-CDK4/6 複合体-Rb 経路の異常な活性化はホルモン受容体陽性乳癌における特徴としても知られている[76]。最近、この CDK4/6 を標的として阻害することにより、細胞周期の進行を阻止する分子標的薬が開発されている。その中でもパルボシクリブ (Fig. 22) は最も早く米国食品医薬品局（Food and Drug Administration : FDA）に承認された CDK4/6 阻害薬であり、サイクリン D1-CDK4/6 複合体と ATP との結合を阻害することで細胞周期進行を阻止している。わが国においてパルボシクリブはホルモン受容体陽性かつ HER2 陰性の手術不能、もしくは再発乳癌に対して内分泌療法との併用で使用されている。パルボシクリブは強力に CDK4/6 を阻害して、細胞周期の進行を抑制するが、種々の代謝に対する作用は脂質代謝を含め、ほとんど解析されていない。そこで本章では乳癌細胞に対するパルボシクリブの脂質代謝に対する作用を明らかにするため、癌の増悪化への関与が示唆されている細胞内脂質の変動[77]やリポタンパク質代謝について、特に LPL の分泌に対する影響に着目し検討した。



**Figure 22. Structure of palbociclib.**

## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬

パルボシクリブは Chem Scene、BAPTA-AM は和光純薬、STO-609 は Cayman Chemical より購入した。パルボシクリブは 0.1 M HCl、BAPTA-AM 及び STO-609 は DMSO に溶解し使用した。

### 第2項 細胞培養

細胞培養の方法は、本論第1章の第2節、第2項に示した。

### 第3項 粗酵素標品作成

粗酵素標品作成方法は、本論第1章の第2節、第3項に示した。

### 第4項 細胞増殖測定

細胞増殖測定方法は、本論第1章の第2節、第4項に示した。

### 第5項 細胞周期解析

第2項で培養した細胞を  $1.5 \times 10^5$  個/mL の密度に調整し、薬剤を添加し培養した。48 時間後、細胞を回収、遠心分離 ( $150 \times g$ , 3 分、4°C) し、上清を取り除いた後、70% エタノールを加え 4°C で 20 分間細胞を固定した。FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) を添加し室温で 20 分間染色を行い、FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて F12-H で測定し、Cell Quest Pro (BD Biosciences) にて解析を行った。

### 第6項 LPL 酵素活性測定

LPL 酵素活性の測定には第3項で作成した LPL 粗酵素標品を用いた。LPL 酵素活性測定は Nilsson-Ehle ら[28]及び Belfrage ら[29]の方法を使用した。基質溶液の作成について、0.2 M Tris[37°C、pH 8.0]、0.3% Triton X-100 及び Triolein, [9,10-3H(N)]- ( $10 \text{ nM}$ ;  $18.5 \text{ mBq/mL}$ ) (PerkinElmer) 20  $\mu\text{L}$  を氷中で、超音波処理 (3 分) して乳化処理し、さらに 10% BSA 60  $\mu\text{L}$ 、0.2 M Tris[37°C、pH 8.0] 7.9  $\mu\text{L}$ 、10% イントラリポス 0.1  $\mu\text{L}$  およびマウス非働化血清 12  $\mu\text{L}$  を加え、37°C で 60 分間温置したものを基質溶液とした。作成した基質溶液

0.1 mL に粗酵素標品 0.1 mL を添加し、37°C で 60 分間温置した。反応は反応停止液（メタノール:クロロホルム:ヘプタン=1.41:1.25:1）3.25 mL を添加して停止させたのち、0.1M Carbonate-borate Buffer を 0.75 mL 加え、10 分間振盪する。FFA を含むアルカリ-メタノール層（上層）を 1 mL バイアルに採取し、リッキシンチ 4 mL を加え、液体シンチレーションカウンター（アロカ製 LSC-6100）で FFA の放射活性を測定した。LPL の活性は 1 M NaCl 存在下でほぼ完全に阻害されることから、1 M NaCl 存在下での LPL 粗酵素標品の値を用いて補正し、LPL 活性を nmol FFA/hr/10<sup>6</sup> cells で表した。

#### 第 7 項 細胞内脂質染色

脂質染色にはナイルレッド（和光純薬）を用いて行った。第 2 項で培養した細胞を 1×10<sup>5</sup> 個/mL の密度に調整し、薬剤を添加し 48 時間培養した。その後、細胞を回収し遠心分離（150 ×g、3 分、4°C）にて上清を取り除き PBS で 2 度洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドにより 15 分間固定した。固定後、0.5 µg/mL ナイルレッドにて 20 分間染色を行った後、FACS Calibur を用いて、脂質の蓄積量を FL2-H、細胞径を FSC-H で測定し、Cell Quest Pro にて解析を行った。

#### 第 8 項 siRNA トランスフェクション

siRNA トランスフェクションは、本論第 1 章の第 2 節、第 8 項に示した。AMPKα1/2 標的とする siRNA（30 nM）（Santa Cruz Biotechnology）及び LPL を標的とする siRNA（50 nM）（Sequence 5'-3' : CAAAGUGUCCAUUACCAA）（Merck）を用いてノックダウンを行った。

#### 第 9 項 ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は、本論第 1 章の第 2 節、第 9 項に示した。一次抗体として抗 AMPKα1/2 抗体、抗 p-AMPKα1/2 抗体（Cell Signaling Technology）、抗 LPL 抗体（Gene Tex）、抗β-アクチン抗体を用いた。

## 第 10 項 統計学的解析

結果は平均±標準誤差 (SE) で示した。有意差検定は、2 群間の比較については Student's *t*-test、多群間の比較については one-way ANOVA 後に Tukey 法または Dunnett 法を用いて行った。また、P 値が 0.05 未満を有意差ありとして解析した。

### 第3節 結果

#### マウス乳癌 FM3A 細胞に対するパルボシクリブの効果

マウス乳癌 FM3A 細胞におけるパルボシクリブの感受性を確認するために、細胞懸濁液にパルボシクリブを添加し 48 時間培養した。その間、FM3A 細胞の増殖の変化を Burker-Turk 血球計算盤を用いて計測した。細胞増殖はパルボシクリブ濃度依存的に抑制され、5  $\mu\text{M}$  では細胞の増殖が完全に抑制された (Fig. 23A)。この細胞に対し propidium iodide 染色を行い、細胞周期の割合変化をフローサイトメーターを用いて測定したところ、1  $\mu\text{M}$  パルボシクリブによって G0/G1 期の細胞割合が有意に増加した (Fig. 23B)。また、パルボシクリブ 1  $\mu\text{M}$  添加後、5 分間培養した細胞において AMPK のリン酸化亢進が認められた (Fig. 23C)。パルボシクリブとともに 48 時間培養した細胞を脂質染色液であるナイルレッドにて染色を行った細胞をフローサイトメーターを用いて測定した。パルボシクリブ処理した細胞は、濃度依存的に脂質の蓄積増加 (Fig. 24A)、及び細胞の膨化が確認された (Fig. 24B)。また細胞径当たりの脂質含量の増加も確認されたため、パルボシクリブは細胞内の脂質密度を増加させる作用を有することが示唆された (Fig. 24C)。臨床の乳癌治療でパルボシクリブを使用した際の最高血漿中濃度は約 0.3  $\mu\text{M}$  であるが、パルボシクリブは組織移行性が高く、また FM3A 細胞における細胞増殖 50%阻害濃度が約 1  $\mu\text{M}$  であったため LPL に対する検討は 1  $\mu\text{M}$  前後で行った。

#### LPL 分泌に対するパルボシクリブの効果

FM3A 細胞をパルボシクリブ処理し、培養後の上清に含まれる LPL を分泌 LPL とした。LPL の活性をラジオエンザイムアッセイ、タンパク質量をウェスタンブロットを用いて測定した。1  $\mu\text{M}$  パルボシクリブでは 60 分まで経時的に分泌 LPL 活性及びタンパク質量の増加が認められた (Fig. 25A, B)。各濃度のパルボシクリブで 1 時間処理したところ、分泌 LPL の活性及びタンパク質量はパルボシクリブ濃度依存的に有意に増加した (Fig. 25C, D)。そこでパルボシクリブによる脂質の蓄積増加と LPL との関係を検討するため、LPL のノックダウンを行った (Fig. 26A)。LPL をノックダウンさせた細胞はコントロール細胞と比較し、細胞増殖が抑制されることが確認された (Fig. 26B)。続いて、パルボシクリブによる脂質の蓄積増加に与える影響を検討した。その結果、LPL ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べてパルボシクリブによる脂質の蓄積増加が有意に抑制されることが確認された (Fig. 26C)。

E2 および MPA による LPL 活性化を抑制した mTORC1/2 阻害剤である KU0063794 をパルボシクリブとともに添加したところ、パルボシクリブによる分泌 LPL の活性抑制は認められなかった (Fig. 27)。また、FM3A 細胞にパルボシクリブ存在下、E2 または MPA を添加したところ、分泌 LPL 活性は相加的に上昇したが、タンパク質量はパルボシクリブ単独と比べ変化は認められなかった (Fig. 28A, B)。

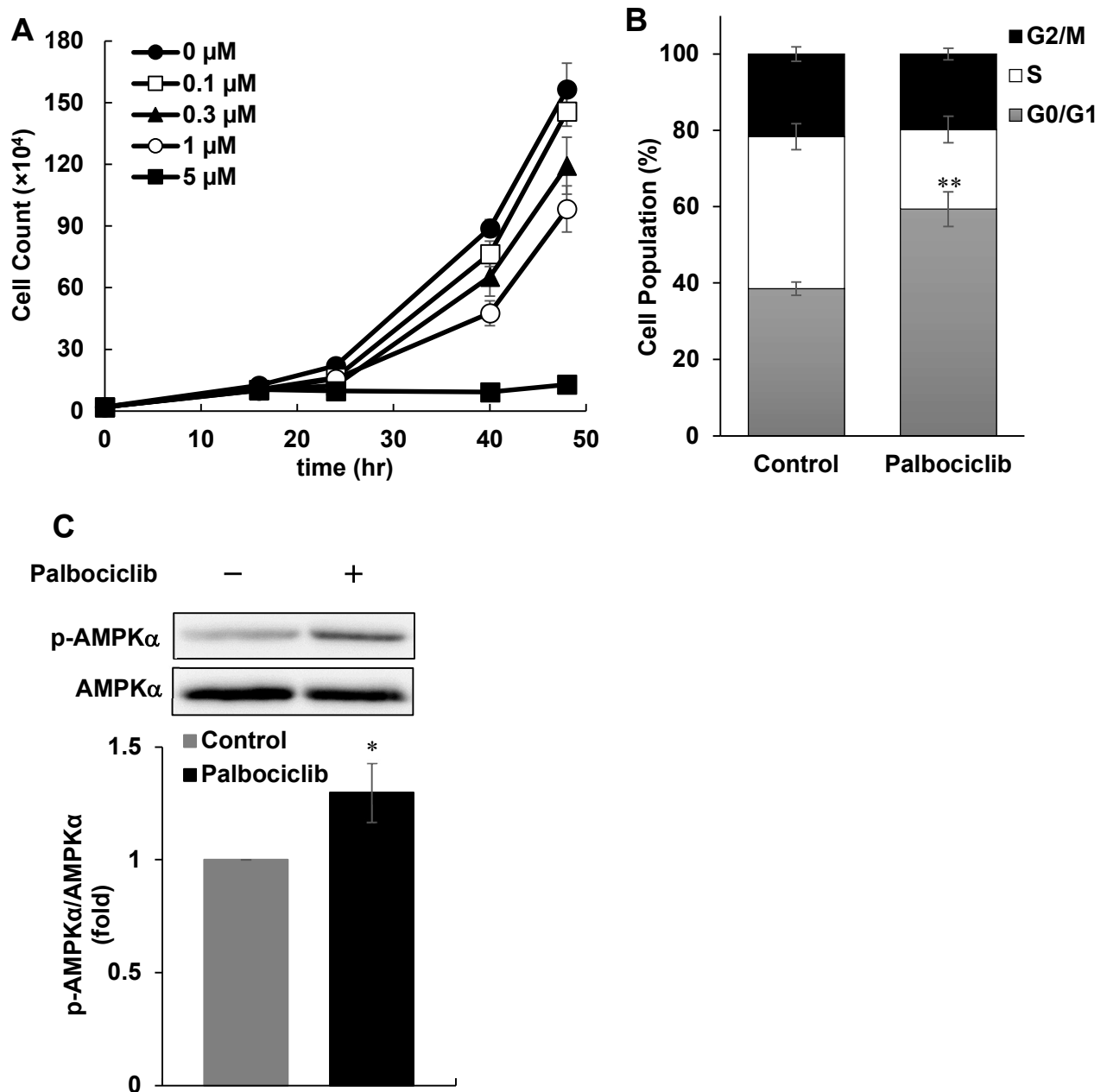
#### パルボシクリブによる LPL 分泌に対するカルシウムシグナリング系の関与

細胞内カルシウム変動と LPL 分泌が関連しているとの報告がある [78]。そこでパルボシクリブによる LPL 分泌のメカニズムを検討するうえで  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリング系の関与を検討した。まず細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤である BAPTA-AM [79] を用いたところ、濃度依存的に LPL 分泌の抑制が認められた (Fig. 29A, B)。続いて、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化されるカルモジュリン (Calmodulin : CaM) に着目した。CaM は  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化され、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼキナーゼ ( $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase : CaMKK) 及び AMPK 等を活性化させることが知られている [80]。CaMKK 阻害剤である STO-609 [81] をパルボシクリブとともに添加すると、LPL 分泌の有意な抑制が確認された (Fig. 30A, B)。

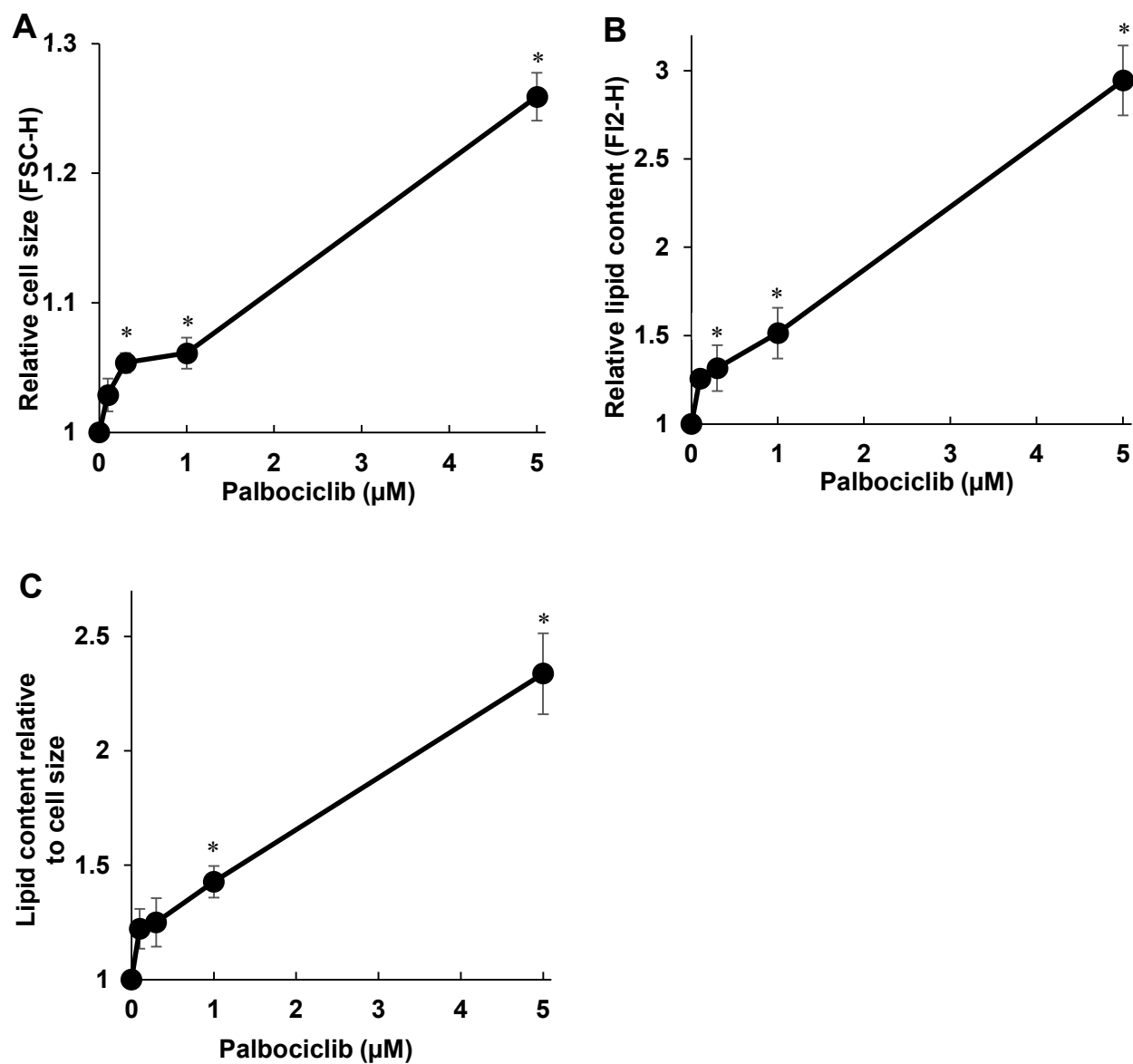
#### AMPK ノックダウンによるパルボシクリブの LPL 分泌の変化

AMPK は CaMKK 等によって活性化され、エネルギー代謝と密接に関係している。そこで、パルボシクリブによる LPL 分泌変化に対する AMPK の関与を検討した。AMPK は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのサブユニットから構成されるヘテロ三量体タンパク質複合体として存在しており、 $\alpha$  サブユニットのリン酸化が主な活性化機序として知られている [82]。FM3A 細胞においてパルボシクリブによる短時間での AMPK リン酸化亢進が認められたことから AMPK の関与が考えられる (Fig. 23C)。そこで AMPK  $\alpha$  のノックダウンを行った (Fig. 31A)。ノックダウンにより AMPK  $\alpha$  の発現量を低下させた細胞ではパルボシクリブによる LPL 分泌の増加は認められなかった (Fig. 31B, C)。

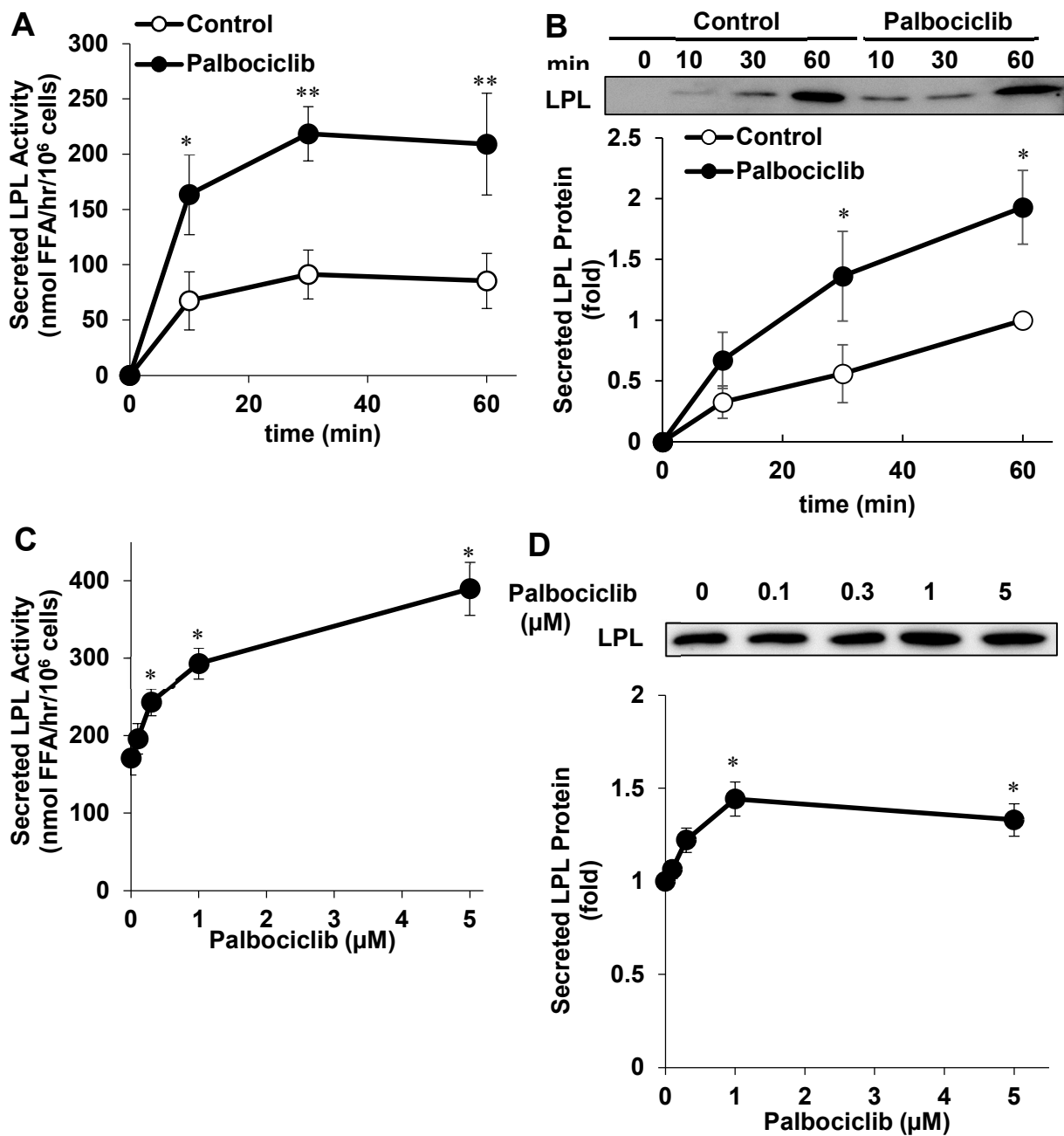




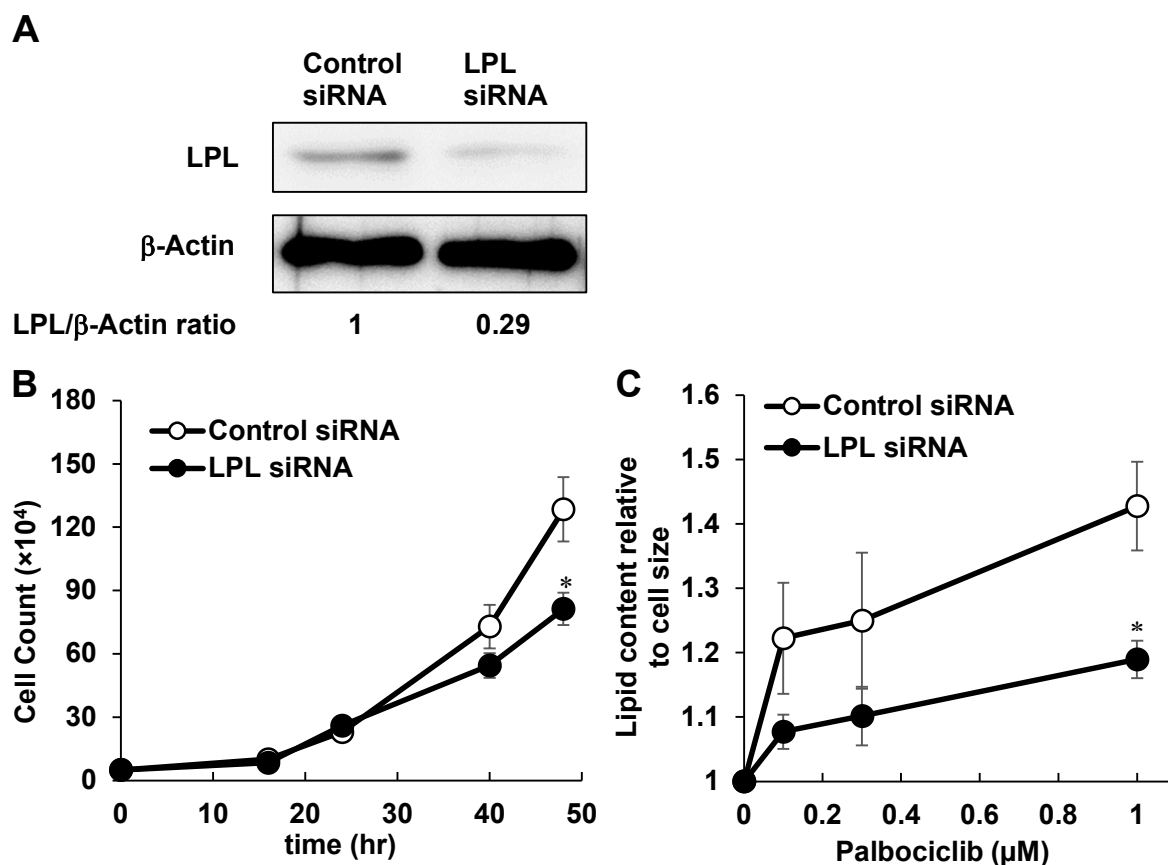
**Figure 23. Effects of palbociclib on growth and phosphorylation of AMPK.** FM3A cells growth after treatment with various palbociclib concentrations for indicated time (A). FM3A cells were treated with or without palbociclib (1  $\mu$ M) for 48 hr and stained with propidium iodide followed by FACS Calibur (B). FM3A cells were treated with or without palbociclib (1  $\mu$ M) for 5 min (C). Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by Student's *t*-test. (n=4) \*P < 0.05, \*\*P < 0.05



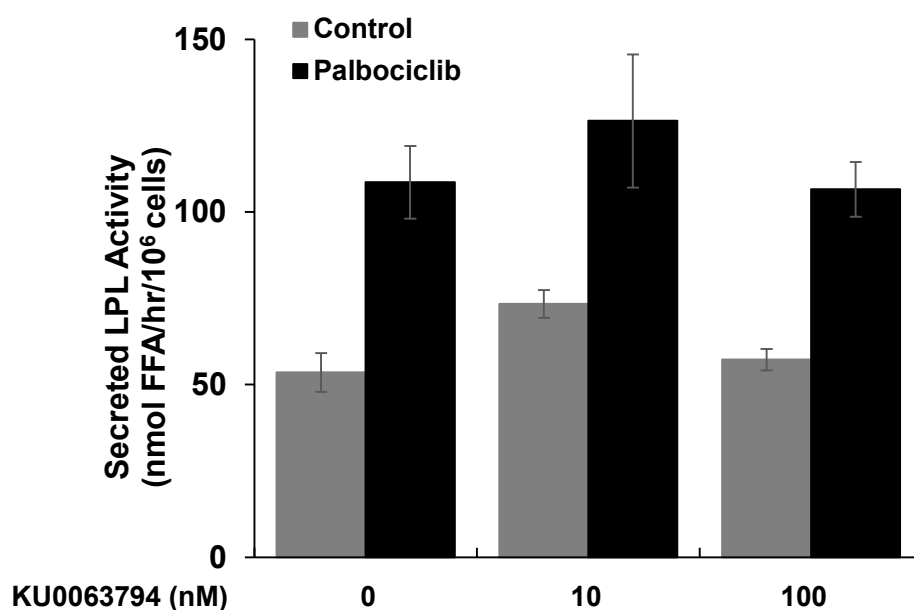
**Figure 24. Effect of palbociclib on lipid accumulation in FM3A cells.** FM3A cells were treated with or without palbociclib for 48 hr and stained with Nile Red (0.5 μg/mL) measured by FACS Calibur. Cell size was measured in Nile Red unstained cells (A) and intracellular lipid content in stained cells (B). B/A was identified as lipid density (C). Data were shown as mean ± SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=4) \*P < 0.05



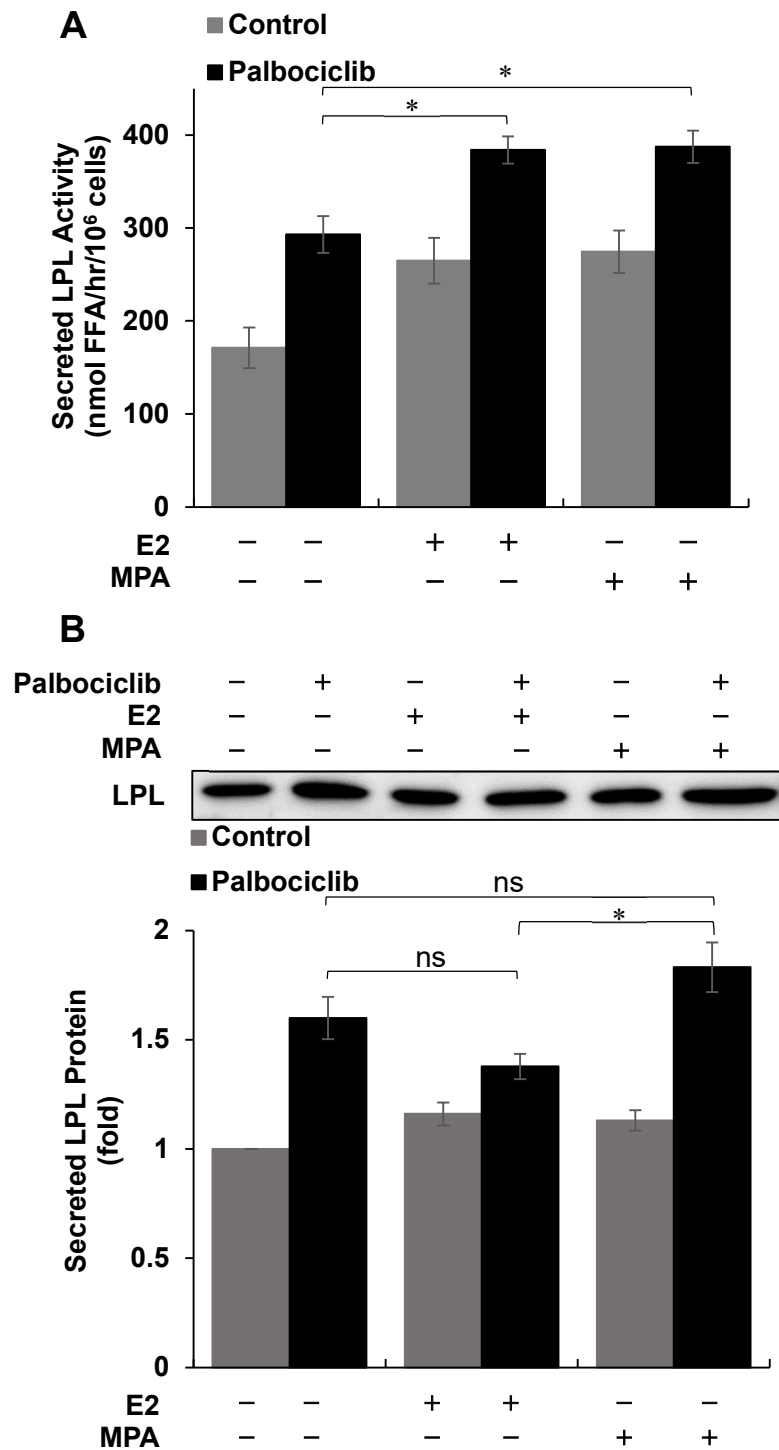
**Figure 25. Effects of palbociclib on stimulatory secretion of LPL from FM3A cells.** FM3A cells were treated with (●) or without (○) palbociclib (1 μM) for indicated time (A, B). Changes on secretion of LPL the cells incubated for 60 min with various concentrations of palbociclib (C, D). The activity (A, C) and protein content (B, D) of LPL secreted into the medium were measured by radio enzyme assay and western blot. Data were shown as mean ± SE. The data were analyzed by Student's *t*-test (A, B; compared to the control) or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test (C, D; compared to untreated palbociclib). (n=6) \*P < 0.05, \*\*P < 0.01



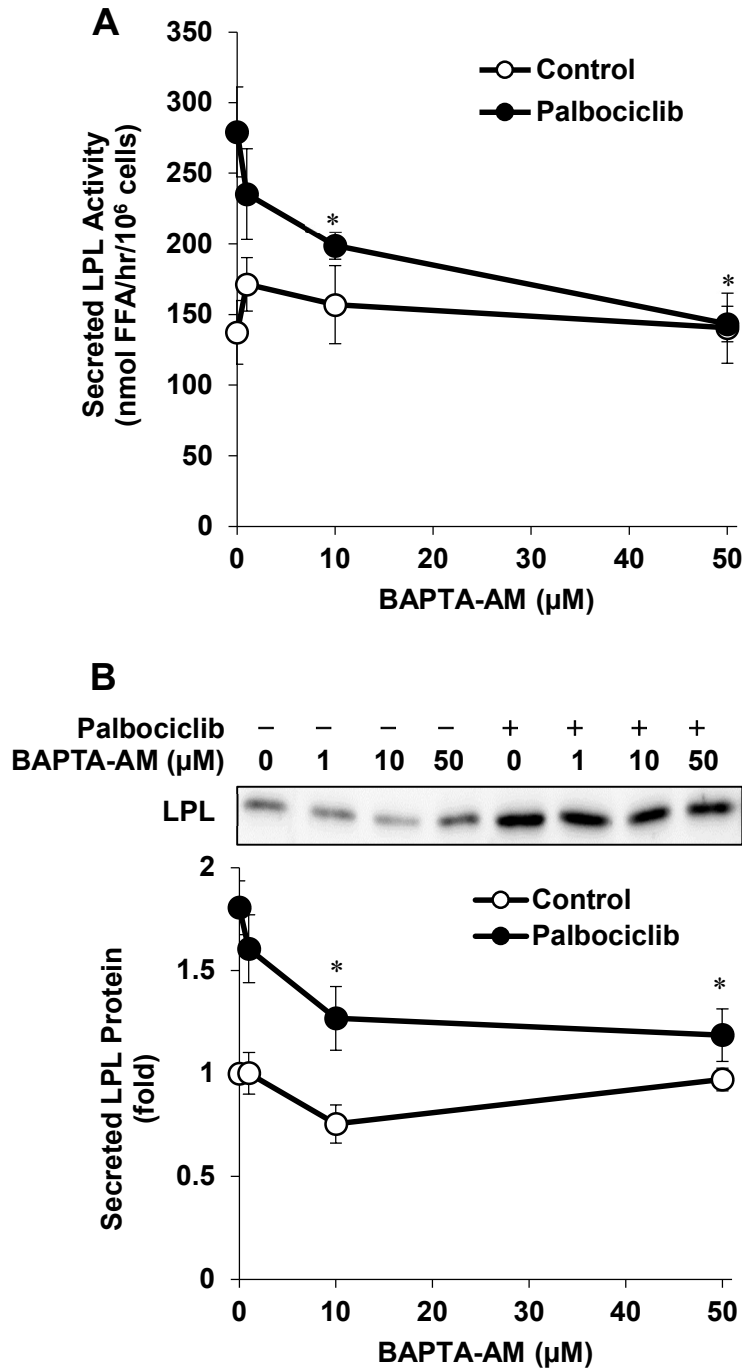
**Figure 26. Effects of LPL knock-down on cell growth and palbociclib-treated lipid accumulation.** FM3A cells were transfected with LPL siRNA and control siRNA. After transfection, protein expression was measured by western blotting. LPL/β-Actin ratio means fold change of LPL to β-actin ratio normalized to control siRNA (A). LPL knock-down cells and control cells were grown for indicated time (B). LPL knock-down cells and control cells were treated with or without palbociclib for 48 hr and stained with Nile Red (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) measured by FACS Calibur (C). Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by Student's *t*-test (B, C; compared to treated control siRNA). (n=4) \*P < 0.05



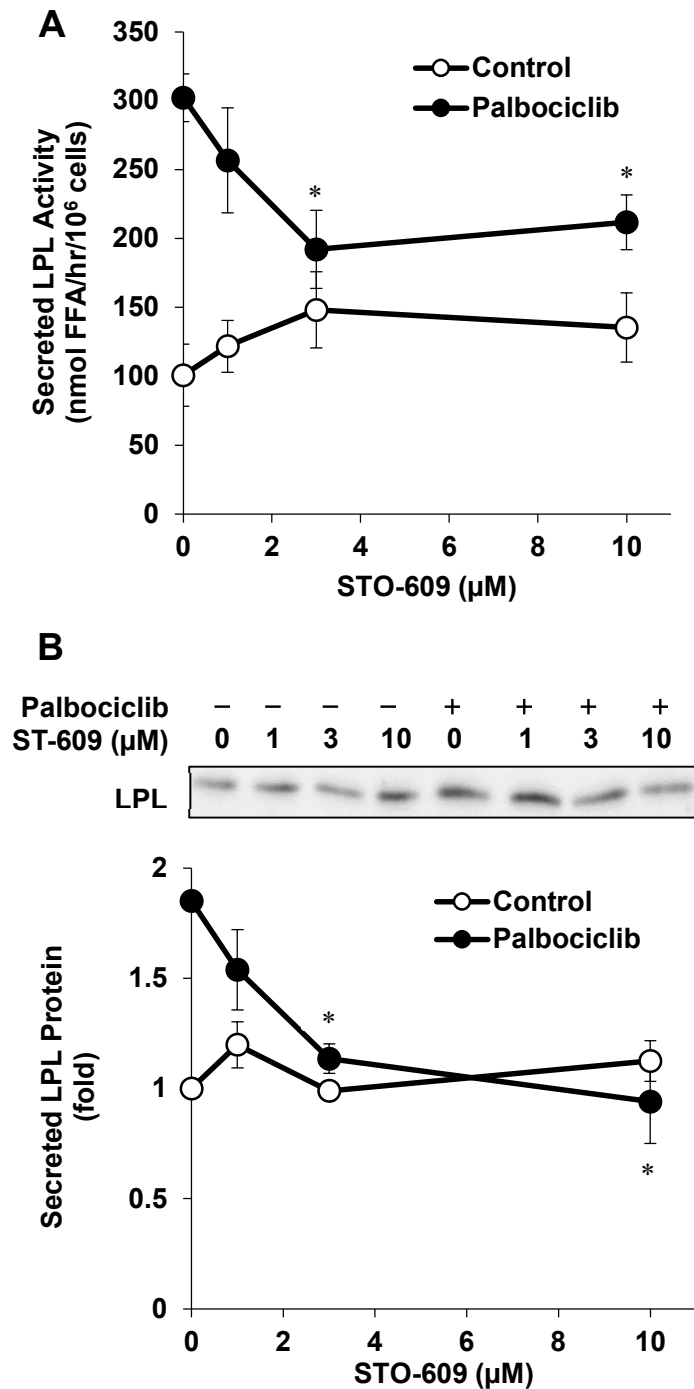
**Figure 27. Effects of mTOR inhibitor on stimulatory secretion of LPL by palbociclib.** FM3A cells were incubated for 60 min with or without palbociclib (1  $\mu$ M) under the pretreatment of KU0063794 for 20 min. The activity of LPL secreted into the medium was measured by radio enzyme assay. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA. (n=6)



**Figure 28. Changes of palbociclib on stimulatory secretion of LPL in combination with E2 or MPA.** FM3A cells were incubated for 60 min with or without palbociclib (1  $\mu$ M) in presence of E2 (10 nM) or MPA (1 nM). The activity (A) and protein content (B) of LPL secreted into the medium were measured by radio enzyme assay and western blot. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (n=6) not significant (ns;  $P > 0.05$ ), \* $P < 0.05$

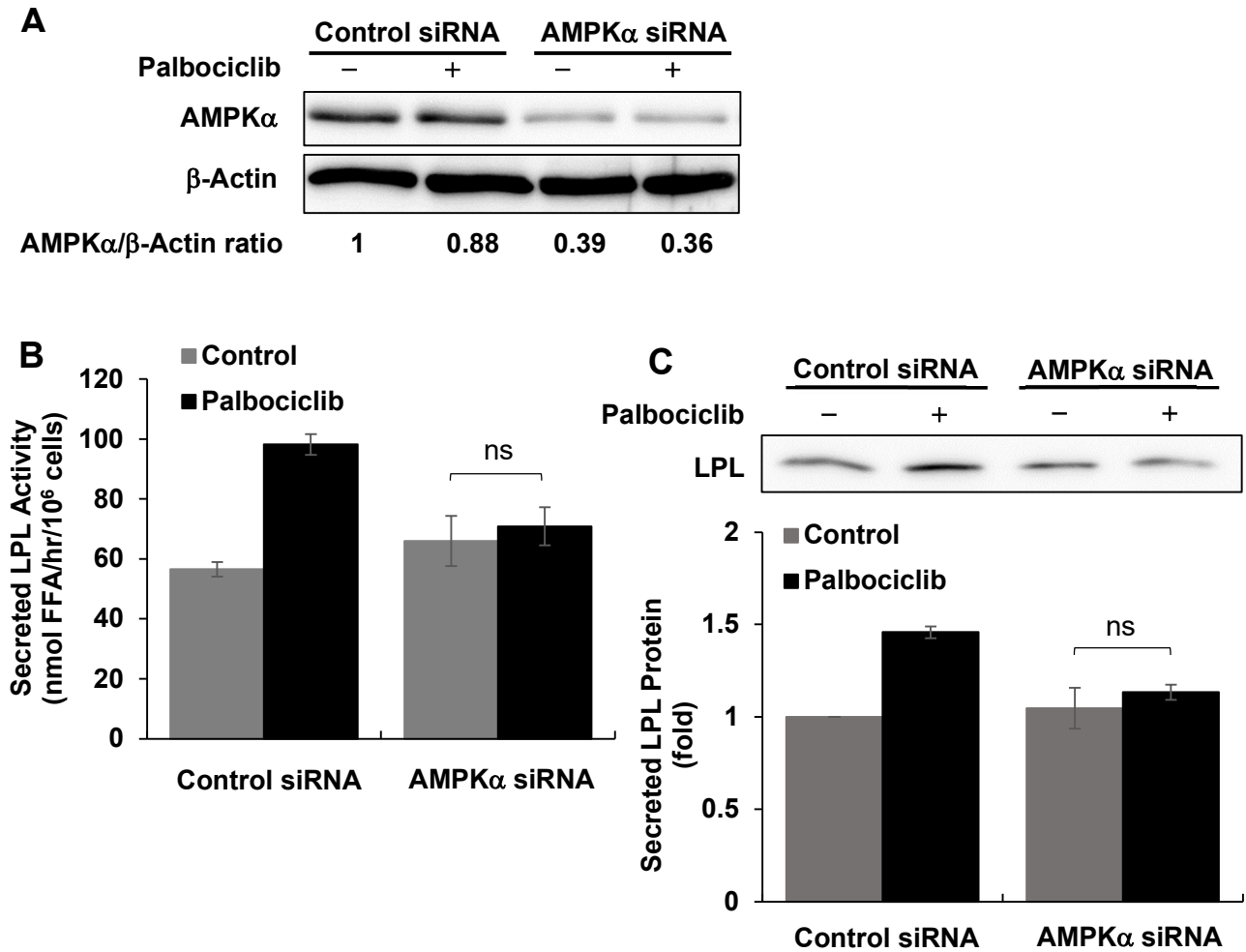


**Figure 29. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  chelator on stimulatory secretion of LPL by palbociclib.** FM3A cells were incubated for 60 min with or without palbociclib (1  $\mu\text{M}$ ) under the pretreatment of BAPTA-AM for 20 min. The activity (A) and protein content (B) of LPL secreted into the medium were measured by radio enzyme assay and western blot. Data were shown as mean  $\pm$  SE. Significant differences were compared to untreated BAPTA-AM and determined by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05



**Figure 30. Effects of CaMKK inhibitor on stimulatory secretion of LPL by palbociclib.** FM3A cells were incubated for 60 min with or without palbociclib (1 μM) under the pretreatment of STO-609 for 20 min. The activity (A) and protein content (B) of LPL secreted into the medium were measured by radio enzyme assay and western blot. Data were shown as mean ± SE. Significant differences were compared to untreated STO-609 and determined by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. (n=6) \*P < 0.05





**Figure 31. Effects of AMPK knock-down on stimulatory secretion of LPL by palbociclib.** FM3A cells were transfected with AMPK siRNA and control siRNA. AMPK knock-down cells were incubated for 60 min with or without palbociclib (1  $\mu$ M). AMPK expression was measured by western blotting. AMPK $\alpha$ / $\beta$ -Actin ratio means fold change of AMPK $\alpha$  to  $\beta$ -actin ratio normalized to control siRNA (A). The activity (B) and protein content (C) of LPL secreted into the medium were measured by radio enzyme assay and western blot. Data were shown as mean  $\pm$  SE. The data were analyzed by Student's *t*-test. (n=4) not significant (ns;  $P > 0.05$ )

## 第4節 考察

CDK による脂質代謝の変動は未だ明らかではない。そこで本研究では CDK による脂質代謝の調節について、現在、ホルモン受容体陽性乳癌の分子標的治療に用いられている CDK4/6 阻害剤パルボシクリブを用いて、主に LPL 分泌に対する変化に着目し検討した。今回用いたマウス乳癌 FM3A 細胞において、パルボシクリブによる LPL 分泌促進作用 (Fig. 25A-D) 及び細胞内脂質の蓄積増加 (Fig. 24C) が認められた。本来、癌細胞の特徴の一つとして脂質の蓄積増加が挙げられる [83]。しかしながら過剰な脂質の蓄積は癌細胞の増殖及び転移能の亢進や治療抵抗性に関与しているとの報告があり、癌細胞の悪性度を示す指標の一つである [84-87]。パルボシクリブによる LPL 分泌増加に伴う脂質の蓄積増加が確認された (Fig. 26C) ことから、この脂質の蓄積増加により薬剤の休薬期間でのリバウンドや、薬剤の耐性化を引き起こす可能性が示唆された。

LPL 分泌機構の一つとして、第 1 章及び第 2 章に記述したように、E2 及び MPA による LPL 活性化は mTORC2 に依存していることが示された。そこでパルボシクリブによる LPL 分泌促進と mTORC2 の関与について阻害剤を用いて検討したが、パルボシクリブによる LPL 分泌は mTORC2 に依存しないことが示された (Fig. 27)。このことからパルボシクリブによる LPL 分泌機構は E2 や MPA とは異なる経路が関与していることが示唆された。LPL 分泌促進機構については  $\text{Ca}^{2+}$  が関係しているとの報告がある [78]。そこで数多くの細胞内シグナルに関与している  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリング系に着目し検討した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレーター (BAPTA-AM) 及び CaMKK 阻害剤 (STO-609) によって LPL 分泌が抑制された (Fig. 29A, B) (Fig. 30A, B) ことから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変動に感受性のある経路の関与が考えられる。

AMPK は細胞内エネルギー量のセンサーとして重要な役割を担っている。エネルギー量の低下 (AMP/ATP 比の増加) により活性化され、エネルギー産生亢進に関与しているタンパク質の発現増加及び活性化により、細胞内エネルギーの恒常性を保っている [88]。脂肪酸代謝における主な AMPK の役割として、アセチル CoA カルボキシラーゼ (Acetyl-CoA Carboxylase: ACC) のリン酸化による脂肪酸合成の抑制及び  $\beta$  酸化の亢進が知られている [89]。また AMPK は筋組織における LPL タンパク質合成の促進、心筋における LPL の細胞膜移行へ関与しているとの報告もある [90,91]。しかしながら癌細胞における AMPK とリポタンパク質代謝との関係は未だ不明である。パルボシクリブと AMPK との関係については、パルボシクリブが AMPK $\alpha$  のリン酸化を亢進するとの報告があり [92]、FM3A 細胞においてもリン

酸化亢進が認められた (Fig. 23C)。そこで AMPK $\alpha$  をノックダウンした乳癌細胞を使用したところ、パルボシクリブによる LPL 分泌が確認されなかった (Fig. 31A-C)。これらの結果から CDK4/6 阻害剤パルボシクリブによる LPL 分泌促進作用は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加に伴う CaMKK-AMPK 経路の活性化に依存していることが示唆された。

## 総括

本研究ではホルモン受容体陽性乳癌であるマウス乳癌 FM3A 細胞を用いて、乳癌細胞の LPL 分泌機構の解析を行った。

第 1 章では MPA による LPL 活性化機構について解析した。FM3A 細胞に MPA を添加すると、低濃度 (20 nM 以下) において分泌 LPL の活性化が認められた。cAMP 含量はごく短時間 (3 分以内) で上昇し、PKA 阻害剤である H-89 によって LPL の活性化が抑制された。MAPK 活性についても短時間での活性化が認められ、MEK、ERK、p38 の阻害剤で MPA による LPL 活性化が抑制された。mTORC1/2 の阻害によって LPL の活性化は抑制されたが、mTORC1 のみの阻害では抑制されなかった。そこで、mTORC2 の構成要素である Rictor をノックダウンした細胞に MPA を添加したが、LPL の活性化は認められなかった。これらの結果から、MPA による LPL 活性化機構は mPRs を介した cAMP 含量の増加に伴う PKA の活性化、それに続く MAPK-mTORC2 経路の活性化に依存していることが明らかになった。

第 2 章では E2 による LPL 活性化機構について解析した。E2 においても LPL の活性化は引き起こされ、その機序として GPER を介した cAMP 含量増加に伴う PKA の活性化及び MAPK、PI3K 並びに mTORC2 を介したものと明らかになった。このように E2 による LPL 活性化機構は低濃度 MPA による LPL 活性化機構と類似していたが、cAMP 含量増加及び MAPK 活性上昇の継続時間や PI3K の関与など、一部異なる反応が示されたため、今後より詳細な解析が必要だと考えられる。

第 3 章では CDK4/6 による LPL 分泌調節機構をホルモン受容体陽性乳癌治療薬であるパルボシクリブを用いて解析した。パルボシクリブによる LPL 分泌促進は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレーターによって抑制されたことから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変化に依存していることが示された。そこで  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化することが知られている、CaM の関与を検討したところ、CaMKK の阻害剤によって LPL 分泌が抑制された。また CaMKK によって活性化される AMPK をノックダウンした細胞を用いたところ、パルボシクリブによる LPL 分泌促進が認められなかった。またパルボシクリブによる脂質の蓄積増加は、AMPK を介した LPL 分泌促進に依存していることも確認された。これらの結果からパルボシクリブによる LPL 分泌調節機構は、CDK4/6 が抑制されることによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加に伴う CaMKK-AMPK 経路の活性化に依存していることが明らかになった。この経路に依存した LPL 分泌促進により脂質の蓄積が増加し、それに伴う癌細胞の悪性化が進行することが考えられるため、CDK4/6 阻害剤のエネルギー代

謝に対する影響のさらなる検討が必要である。

LPL は体内の脂質代謝において重要な働きをしているが、癌細胞におけるその活性化修飾過程及び分泌過程の調節メカニズムはあまり明らかにはなっていない。本研究において、ホルモン受容体陽性乳癌における LPL 分泌機構には mTORC2 を介した LPL 活性化機構及び AMPK を介した LPL 分泌促進機構が存在することが明らかになった (Fig. 32)。また本研究の結果から、乳癌治療における内分泌療法は癌細胞の脂質代謝の面からもより有用であることが認められた。一方、細胞周期に対する分子標的薬による脂質代謝への関与を見出した。これらの研究成果により癌細胞の脂質代謝に着目した治療による癌性羸瘦の改善や薬物治療後の癌細胞の再活性化抑制等、新しい治療方法に貢献することが期待される。

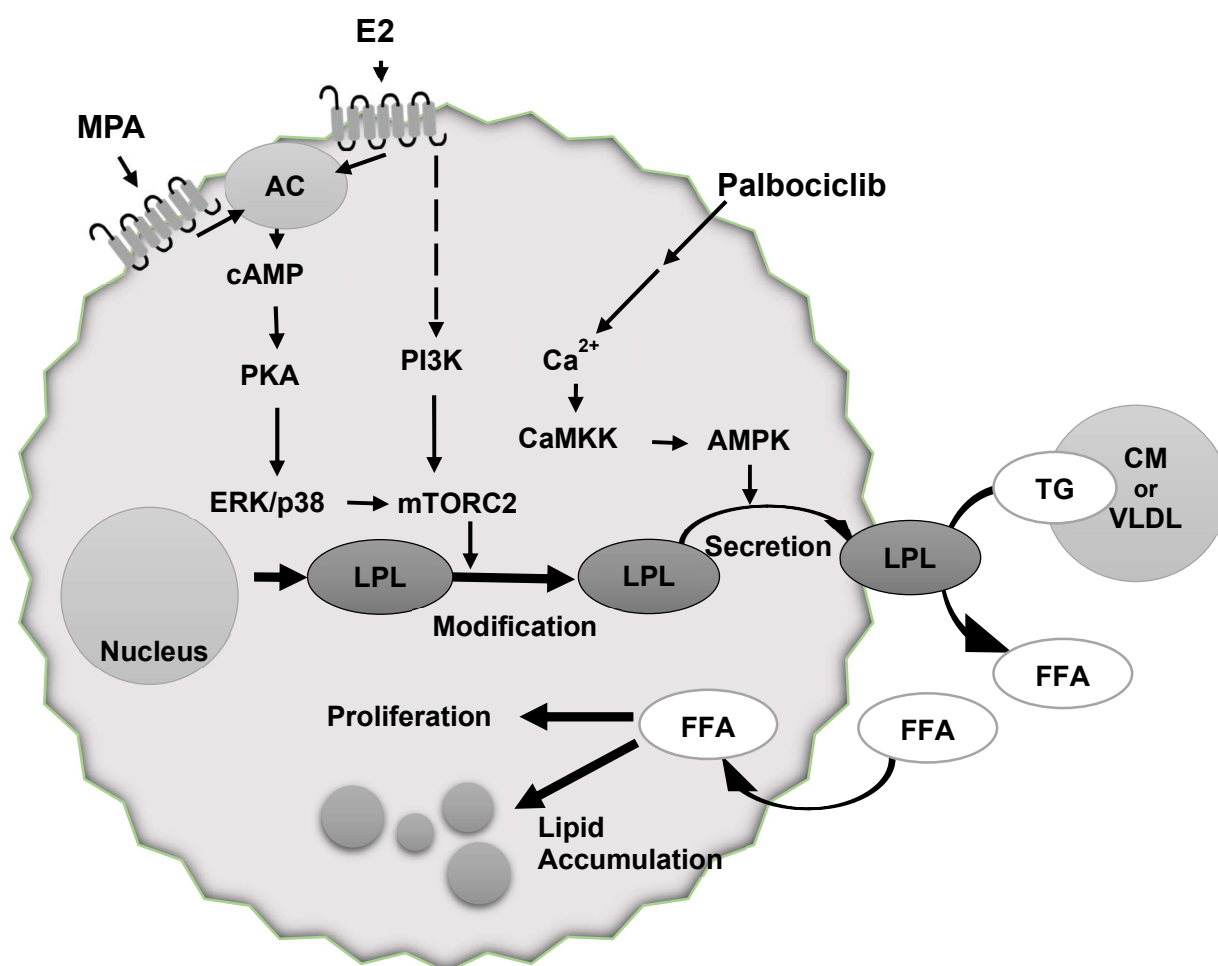


Figure 32. Secretion mechanisms of LPL in mouse mammary tumor FM3A cells.

## 謝辞

本研究を遂行並びに本論文作成するにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、恩師 福山大学薬学部生化学研究室 森田哲生教授に謹んで感謝致します。

また、研究遂行に有益なる御協力、御助言を賜りました福山大学薬学部生化学研究室 上敷領淳准教授に深く感謝致します。

最後に、本論文の審査にあたり有益なる御指導、御助言をいただきました福山大学薬学部医薬品化学研究室 町支臣成教授、衛生薬学研究室 竹田修三教授、臨床薬効解析学研究室 佐藤雄己教授に深く感謝致します。

## 引用文献

- [1] 国立がん研究センターがん情報サービス 「がん統計」, 2018.
- [2] K. Wada, C. Nagata, A. Tamakoshi, K. Matsuo, I. Oze, K. Wakai, I. Tsuji, Y. Sugawara, T. Mizoue, K. Tanaka, M. Iwasaki, M. Inoue, S. Tsugane, S. Sasazuki, Body mass index and breast cancer risk in Japan: A pooled analysis of eight population-based cohort studies, *Ann. Oncol.* 25 (2014) 519–524. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt542>.
- [3] C. Mantzoros, E. Petridou, N. Dessypris, C. Chavelas, M. Dalamaga, D.M. Alexe, Y. Papadiamantis, C. Markopoulos, E. Spanos, G. Chrousos, D. Trichopoulos, Adiponectin and breast cancer risk, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 1102–1107. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031804>.
- [4] C. Kang, D. Leroith, E.J. Gallagher, Diabetes, Obesity, and Breast Cancer, *Endocrinology*. 159 (2018) 3801–3812. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00574>.
- [5] A.L. Gross, C.J. Newschaffer, J. Hoffman-Bolton, N. Rifai, K. Visvanathan, Adipocytokines, inflammation, and breast cancer risk in postmenopausal women: A prospective study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 22 (2013) 1319–1324. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-1444>.
- [6] I. Rybinska, R. Agresti, A. Trapani, E. Tagliabue, T. Triulzi, Adipocytes in Breast Cancer, the Thick and the Thin, *Cells*. 9 (2020) 1–22. <https://doi.org/10.3390/cells9030560>.
- [7] P. Eroles, A. Bosch, J. Alejandro Pérez-Fidalgo, A. Lluch, Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 698–707. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2011.11.005>.
- [8] P. Bhardwaj, C.C. Au, A. Benito-Martin, H. Ladumor, S. Oshchepkova, R. Moges, K.A. Brown, Estrogens and breast cancer: mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 189 (2019) 161. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2019.03.002>.
- [9] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* (80-. ). 123 (1956) 309–314. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.123.3191.309>.
- [10] M.P. Thompson, S.T. Cooper, B.R. Parry, J.A. Tuckey, Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1180 (1993) 236–242. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(93\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0925-4439(93)90044-2).
- [11] J. Huang, L. Li, J. Lian, S. Schauer, P.W. Vesely, D. Kratky, G. Hoefler, R. Lehner,

- Tumor-Induced Hyperlipidemia Contributes to Tumor Growth, *Cell Rep.* 15 (2016) 336–348. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.03.020>.
- [12] M. Merkel, R.H. Eckel, I.J. Goldberg, Lipoprotein lipase, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 1997–2006. <https://doi.org/10.1194/JLR.R200015-JLR200>.
- [13] S. Kersten, Physiological regulation of lipoprotein lipase, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1841 (2014) 919–933. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2014.03.013>.
- [14] A. Inui, Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management, *CA. Cancer J. Clin.* 52 (2002) 72–91. <https://doi.org/10.3322/canjclin.52.2.72>.
- [15] H. Podgornik, M. Sok, I. Kern, J. Marc, D. Cerne, Lipoprotein lipase in non-small cell lung cancer tissue is highly expressed in a subpopulation of tumor-associated macrophages, *Pathol. Res. Pract.* 209 (2013) 516–520. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.06.004>.
- [16] N.B. Kuemmerle, E. Rysman, P.S. Lombardo, J. Alison, B.C. Lipe, W.A. Wells, J.R. Pettus, H.M. Froehlich, V.A. Memoli, P.M. Morganelli, J. V Swinnen, A. Luika, L. Chaychi, C.J. Fricano, B.L. Eisenberg, B. William, W.B. Kinlaw, Lipoprotein lipase links dietary fat to solid tumor cell proliferation, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2012) 427–436. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0802.Lipoprotein>.
- [17] K. Sakayama, H. Masuno, T. Miyazaki, H. Okumura, T. Shibata, H. Okuda, Existence of Lipoprotein Lipase in Human Sarcomas and Carcinomas, *Japanese J. Cancer Res.* 85 (1994) 515–521. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1994.tb02389.x>.
- [18] Z. Trost, M. Sok, J. Marc, D. Cerne, Increased Lipoprotein Lipase Activity in Non-small Cell Lung Cancer Tissue Predicts Shorter Patient Survival, *Arch. Med. Res.* 40 (2009) 364–368. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2009.05.001>.
- [19] H. Wang, R.H. Eckel, Lipoprotein lipase: from gene to obesity, *Am. J. Physiol. Metab.* 297 (2009) 271–288. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.90920.2008>.
- [20] Y. Morel, F. Roucher, I. Plotton, C. Goursaud, V. Tardy, D. Mallet, Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis, *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 77 (2016) 82–89. <https://doi.org/10.1016/J.ANDO.2016.04.023>.
- [21] A.O. Mueck, X. Ruan, H. Seeger, T. Fehm, H. Neubauer, Genomic and non-genomic actions of progestogens in the breast, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 142 (2014) 62–67. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2013.08.011>.
- [22] 日本乳癌学会 \_ 乳癌診療ガイドライン2018年版, 2018.



- [23] M. Maltoni, O. Nanni, E. Scarpi, D. Rossi, P. Serra, D. Amadori, High-dose progestins for the treatment of cancer anorexia–cachexia syndrome: A systematic review of randomised clinical trials, *Ann. Oncol.* 12 (2001) 289–300.  
<https://doi.org/10.1023/A:1011156811739>.
- [24] C. Madeddu, A. Macciò, F. Panzone, F.M. Tanca, G. Mantovani, Medroxyprogesterone acetate in the management of cancer cachexia, *Expert Opin. Pharmacother.* 10 (2009) 1359–1366. <https://doi.org/10.1517/14656560902960162>.
- [25] E.J. Roeland, K. Bohlke, V.E. Baracos, E. Bruera, E. Del Fabbro, S. Dixon, M. Fallon, J. Herrstedt, H. Lau, M. Platek, H.S. Rugo, H.H. Schnipper, T.J. Smith, W. Tan, C.L. Loprinzi, Management of cancer cachexia: ASCO guideline, *J. Clin. Oncol.* 38 (2020) 2438–2453. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00611>.
- [26] J.S. Carroll, T.E. Hickey, G.A. Tarulli, M. Williams, W.D. Tilley, Deciphering the divergent roles of progestogens in breast cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2016 171. 17 (2016) 54–64. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.116>.
- [27] E. Lim, G. Tarulli, N. Portman, T.E. Hickey, W.D. Tilley, C. Palmieri, Pushing estrogen receptor around in breast cancer, *Endocr. Relat. Cancer.* 23 (2016) T227–T241. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0427>.
- [28] P. Nilsson-Ehle, H. Tornqvist, P. Belfrage, Rapid determination of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue, *Clin. Chim. Acta.* 42 (1972) 383–390.
- [29] P. Belfrage, M. Vaughan, Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides., *J. Lipid Res.* 10 (1969) 341–344.  
[https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)43094-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)43094-9).
- [30] I.M. Ferby, I. Waga, C. Sakanaka, K. Kume, T. Shimizu, Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation induced by platelet-activating factor in guinea pig neutrophils, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 30485–30488. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)43839-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)43839-2).
- [31] A.J. Murray, Pharmacological PKA inhibition: All may not be what it seems, *Sci. Signal.* 1 (2008) 1–7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.122re4>.
- [32] W. Szymanski, M. Zwolinska, S. Klossowski, I. Młynarczuk-Biały, Ł. Biały, T. Issat, J. Malejczyk, R. Ostaszewski, Synthesis of novel, peptidic kinase inhibitors with cytostatic/cytotoxic activity, *Bioorganic Med. Chem.* 22 (2014) 1773–1781.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.01.005>.
- [33] M. Otori, T. Kinoshita, M. Okubo, K. Sato, A. Yamazaki, H. Arakawa, S. Nishimura, N. Inamura, H. Nakajima, M. Neya, H. Miyake, T. Fujii, Identification of a selective

- ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (2005) 357–363.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.082>.
- [34] S. Nemoto, J. Xiang, S. Huang, A. Lin, Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 $\beta$  mitogen- activated protein kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16415–16420. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16415>.
- [35] M. Schmidt, Y. Budirahardja, R. Klompaker, R.H. Medema, Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1, *EMBO Rep.* 6 (2005) 866–872. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400483>.
- [36] S.I. Gharbi, M.J. Zvelebil, S.J. Shuhleworth, T. Hancox, N. Saghir, J.F. Timms, M.D. Waterfield, Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002, *Biochem. J.* 404 (2007) 15. <https://doi.org/10.1042/BJ20061489>.
- [37] X.M. Ma, J. Blenis, Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 307–318. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>.
- [38] J.M. García-Martínez, J. Moran, R.G. Clarke, A. Gray, S.C. Cosulich, C.M. Chresta, D.R. Alessi, Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR), *Biochem. J.* 421 (2009) 29–42. <https://doi.org/10.1042/BJ20090489>.
- [39] S.R. Edwards, T.J. Wandless, The Rapamycin-Binding Domain of the Protein Kinase mTOR is a Destabilizing Domain, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 13395–13401. <https://doi.org/10.1074/JBC.M700498200>.
- [40] X. Chen, M. Liu, Y. Tian, J. Li, Y. Qi, D. Zhao, Z. Wu, M. Huang, C.C.L. Wong, H.W. Wang, J. Wang, H. Yang, Y. Xu, Cryo-EM structure of human mTOR complex 2, *Cell Res.* 28 (2018) 518–528. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0029-3>.
- [41] M. Saitoh, M. Ohmichi, K. Takahashi, J. Kawagoe, T. Ohta, M. Doshida, T. Takahashi, H. Igarashi, A. Mori-Abe, B. Du, S. Tsutsumi, H. Kurachi, Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor- $\kappa$  B cascade in human breast cancer cells, *Endocrinology.* 146 (2005) 4917–4925. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1535>.
- [42] R.P. Carnevale, C.J. Proietti, M. Salatino, A. Urtreger, G. Peluffo, D.P. Edwards, V. Boonyaratanakornkit, E.H. Charreau, E.B. De Kier Joffé, R. Schillaci, P. V. Elizalde, Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1335–1358. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0304>.

- [43] T. Motoyashiki, T. Morita, H. Ueki, Involvement of the rapid increase in cAMP content in the vanadate-stimulated release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads, *Biol. Pharm. Bull.* 19 (1996) 1412–1416. <https://doi.org/10.1248/BPB.19.1412>.
- [44] P. Savoia, P. Fava, F. Casoni, O. Cremona, Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1483. <https://doi.org/10.3390/IJMS20061483>.
- [45] J. Lu, J. Reese, Y. Zhou, E. Hirsch, Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells, *J. Endocrinol.* 224 (2015) 183. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0470>.
- [46] M. Salazar, A. Lerma-Ortiz, G.M. Hooks, A.K. Ashley, R.L. Ashley, Progesterin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors, *Gene*. 592 (2016) 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.044>.
- [47] L. Bar-Peled, D.M. Sabatini, Regulation of mTORC1 by amino acids, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 400–406. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2014.03.003>.
- [48] A. Hahn-Windgassen, V. Nogueira, C.-C. Chen, J.E. Skeen, N. Sonenberg, N. Hay, Akt Activates the Mammalian Target of Rapamycin by Regulating Cellular ATP Level and AMPK Activity \*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 32081–32089. <https://doi.org/10.1074/JBC.M502876200>.
- [49] A.R. Malik, M. Urbanska, M. MacIas, A. Skalecka, J. Jaworski, Beyond control of protein translation: What we have learned about the non-canonical regulation and function of mammalian target of rapamycin (mTOR), *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1834 (2013) 1434–1448. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2012.12.010>.
- [50] A.C. Gingras, B. Raught, N. Sonenberg, eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 913–963. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.68.1.913>.
- [51] P.E. Burnett, R.K. Barrow, N.A. Cohen, S.H. Snyder, D.M. Sabatini, RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1, *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 95 (1998) 1432–1437.
- [52] T. Noda, Y. Ohsumi, Tor, a Phosphatidylinositol Kinase Homologue, Controls Autophagy in Yeast, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3963–3966. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.7.3963>.
- [53] J. Huang, C.C. Dibble, M. Matsuzaki, B.D. Manning, The TSC1-TSC2 Complex Is Required for Proper Activation of mTOR Complex 2, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 4104–

4115. <https://doi.org/10.1128/MCB.00289-08>.
- [54] W. Huang, P.J. Zhu, S. Zhang, H. Zhou, L. Stoica, M. Galiano, K. Krnjević, G. Roman, M. Costa-Mattioli, mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory, *Nat. Neurosci.* 16 (2013) 441–448. <https://doi.org/10.1038/nn.3351>.
  - [55] A.A. Knowlton, A.R. Lee, Estrogen and the Cardiovascular System, *Pharmacol. Ther.* 135 (2012) 54–70. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2012.03.007>.
  - [56] Y. Imbert-Fernandez, B.F. Clem, J. O’Neal, D.A. Kerr, R. Spaulding, L. Lanceta, A.L. Clem, S. Telang, J. Chesney, Estradiol Stimulates Glucose Metabolism via 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3), *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 9440. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.529990>.
  - [57] F. O’Mahony, M. Razandi, A. Pedram, B.J. Harvey, E.R. Levin, Estrogen Modulates Metabolic Pathway Adaptation to Available Glucose in Breast Cancer Cells, *Mol. Endocrinol.* 26 (2012) 2058. <https://doi.org/10.1210/ME.2012-1191>.
  - [58] M. Maczis, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine-1-phosphate and estrogen signaling in breast cancer, *Adv. Biol. Regul.* 60 (2016) 160–165. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2015.09.006>.
  - [59] C. Wang, I.P. Uray, A. Mazumdar, J.A. Mayer, P.H. Brown, SLC22A5/OCTN2 expression in breast cancer is induced by estrogen via a novel intronic estrogen-response element (ERE), *Breast Cancer Res. Treat.* 134 (2012) 101. <https://doi.org/10.1007/S10549-011-1925-0>.
  - [60] S. Nilsson, S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, J.-Å. Gustafsson, Mechanisms of Estrogen Action, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.4.1535>.
  - [61] C.M. Klinge, Estrogen receptor interaction with estrogen response elements, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.14.2905>.
  - [62] S. Clark, J. Rainville, X. Zhao, B.S. Katzenellenbogen, D. Pfaff, N. Vasudevan, Estrogen receptor-mediated transcription involves the activation of multiple kinase pathways in neuroblastoma cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139 (2014) 45–53. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2013.09.010>.
  - [63] E.J. Filardo, J.A. Quinn, K.I. Bland, A.R. Frackelton, Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF, *Mol. Endocrinol.* 14 (2000) 1649–1660.

- <https://doi.org/10.1210/MEND.14.10.0532>.
- [64] C.-Y. Wang, C.-C. Chiao, N.N. Phan, C.-Y. Li, Z.-D. Sun, J.-Z. Jiang, J.-H. Hung, Y.-L. Chen, M.-C. Yen, T.-Y. Weng, W.-C. Chen, H.-P. Hsu, M.-D. Lai, Gene signatures and potential therapeutic targets of amino acid metabolism in estrogen receptor-positive breast cancer, *Am. J. Cancer Res.* 10 (2020) 95.
  - [65] M.C. de A. Junior, Lipoprotein Lipase : A General Review Lipoprotein Lipase : Historical Hallmarks , Enzymatic Activity , Characterization , and Present Relevance in Human Pathophysiology and Therapeutics, *IMedPub Journals.* 2 (2018) 1–14.  
<https://doi.org/10.21767/2573-4466.1000>.
  - [66] D. Liu, A. Deschamps, K.S. Korach, E. Murphy, Estrogen-enhanced gene expression of lipoprotein lipase in heart is antagonized by progesterone, *Endocrinology.* 149 (2008) 711–716. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0620>.
  - [67] A.L. Magnusson-Olsson, B. Hamark, A. Ericsson, M. Wennergren, T. Jansson, T.L. Powell, Gestational and hormonal regulation of human placental lipoprotein lipase, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2551–2561. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600098-JLR200>.
  - [68] G. Sharma, E.R. Prossnitz, G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) and Sex-Specific Metabolic Homeostasis, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1043 (2017) 427.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_20).
  - [69] E.J. Filardo, J.A. Quinn, K.I. Bland, A.R. Frackelton, Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF, *Mol. Endocrinol.* 14 (2000) 1649–1660.  
<https://doi.org/10.1210/MEND.14.10.0532>.
  - [70] M. Razandi, A. Pedram, E.R. Levin, Estrogen Signals to the Preservation of Endothelial Cell Form and Function, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38540–38546.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M007555200>.
  - [71] P. du Rusquec, C. Blonz, J.S. Frenel, M. Campone, Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in estrogen-receptor positiveHER2 negative advanced breast cancer, *Ther. Adv. Med. Oncol.* 12 (2020). <https://doi.org/10.1177/1758835920940939>.
  - [72] P. Y. Maximov, T. M. Lee, V. Craig Jordan, The Discovery and Development of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) for Clinical Practice, *Curr. Clin. Pharmacol.* 8 (2013) 135–55.
  - [73] L.A. deGraffenried, W.E. Friedrichs, D.H. Russell, E.J. Donzis, A.K. Middleton, J.M. Silva, R.A. Roth, M. Hidalgo, Inhibition of mTOR Activity Restores Tamoxifen

- Response in Breast Cancer Cells with Aberrant Akt Activity, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 8059–8067. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0035>.
- [74] F.S. Kenny, R. Hui, E.A. Musgrove, J.M.W. Gee, R.W. Blamey, R.I. Nicholson, R.L. Sutherland, J.F.R. Robertson, Overexpression of Cyclin D1 Messenger RNA Predicts for Poor Prognosis in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2069–76.
- [75] D.O. Morgan, Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (2003) 261–291. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.13.1.261>.
- [76] T. VanArsdale, C. Boshoff, K.T. Arndt, R.T. Abraham, Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D–CDK4/6 Axis for Cancer Treatment, *Clin. Cancer Res.* 21 (2015) 2905–2910. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0816>.
- [77] L. Tirinato, F. Pagliari, T. Limongi, M. Marini, A. Falqui, J. Seco, P. Candeloro, C. Liberale, E. Di Fabrizio, An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells, *Stem Cells Int.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/1656053>.
- [78] H. Ueki, M. Sera, K. Tanaka, Stimulatory release of lipoprotein lipase activity from rat fat pads by vanadate, *Arch. Biochem. Biophys.* 272 (1989) 18–24. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90189-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90189-6).
- [79] Q. Tang, M.W. Jin, J.Z. Xiang, M.Q. Dong, H.Y. Sun, C.P. Lau, G.R. Li, The membrane permeable calcium chelator BAPTA-AM directly blocks human ether a-go-go-related gene potassium channels stably expressed in HEK 293 cells, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 1596–1607. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2007.07.042>.
- [80] A. Woods, K. Dickerson, R. Heath, S.P. Hong, M. Momcilovic, S.R. Johnstone, M. Carlson, D. Carling, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$  acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells, *Cell Metab.* 2 (2005) 21–33. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2005.06.005>.
- [81] H. Tokumitsu, H. Inuzuka, Y. Ishikawa, M. Ikeda, I. Saji, R. Kobayashi, STO-609, a Specific Inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 15813–15818. <https://doi.org/10.1074/JBC.M201075200>.
- [82] S.A. Hawley, M. Davison, A. Woods, S.P. Davies, R.K. Beri, D. Carling, D.G. Hardie, Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27879–27887. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.44.27879>.

- [83] P.T. Bozza, J.P.B. Viola, Lipid droplets in inflammation and cancer, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 82 (2010) 243–250.  
<https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2010.02.005>.
- [84] A.S. Zembroski, C. Andolino, K.K. Buhman, D. Teegarden, Proteomic Characterization of Cytoplasmic Lipid Droplets in Human Metastatic Breast Cancer Cells, *Front. Oncol.* 11 (2021) 1. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.576326>.
- [85] M.T. Accioly, P. Pacheco, C.M. Maya-Monteiro, N. Carrossini, B.K. Robbs, S.S. Oliveira, C. Kaufmann, J.A. Morgado-Diaz, P.T. Bozza, J.P.B. Viola, Lipid Bodies Are Reservoirs of Cyclooxygenase-2 and Sites of Prostaglandin-E2 Synthesis in Colon Cancer Cells, *Cancer Res.* 68 (2008) 1732–1740. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1999>.
- [86] A.K. Cotte, V. Aires, M. Fredon, E. Limagne, V. Derangère, M. Thibaudin, E. Humblin, A. Scagliarini, J.-P.P. de Barros, P. Hillon, F. Ghiringhelli, D. Delmas, Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-mediated lipid droplet production supports colorectal cancer chemoresistance, *Nat. Commun.* 9 (2018).  
<https://doi.org/10.1038/S41467-017-02732-5>.
- [87] B. Qiu, D. Ackerman, D.J. Sanchez, B. Li, J.D. Ochocki, A. Grazioli, E. Bobrovnikova-Marjon, J.A. Diehl, B. Keith, M.C. Simon, HIF-2 $\alpha$  dependent lipid storage promotes endoplasmic reticulum homeostasis in clear cell renal cell carcinoma, *Cancer Discov.* 5 (2015) 652–667. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1507>.
- [88] D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley, AMPK - a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 251.  
<https://doi.org/10.1038/NRM3311>.
- [89] D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase-an energy sensor that regulates all aspects of cell function, *Genes Dev.* 25 (2011) 1895–1908.  
<https://doi.org/10.1101/GAD.17420111>.
- [90] T. Sasaki, R. Nakata, H. Inoue, M. Shimizu, J. Inoue, R. Sato, Role of AMPK and PPAR  $\gamma$  1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Metab.* 306 (2014) 1085–1092. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00691.2013>.
- [91] D. An, T. Pulinilkunnil, D. Qi, S. Ghosh, A. Abrahani, B. Rodrigues, The metabolic “switch” AMPK regulates cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 288 (2005) 246–253.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00211.2004>.
- [92] F. Hsieh, Y. Chen, M. Hung, P. Chu, M. Tsai, L. Chen, Y. Hsiao, C. Shih, M. Chang,

T. Chao, C. Shiau, K. Chen, Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6 - independent manner, *Mol. Oncol.* 11 (2017) 1035. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12072>.



## 論文目録

本研究の主要部分は以下の論文に公表した。

1. **Tomoyasu Fujii**, Mizuho Ogasawara, Jun Kamishikiryo, Tetsuo Morita.  $\beta$  -Estradiol Enhanced Secretion of Lipoprotein Lipase from Mouse Mammary Tumor FM3A Cells. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(9):1407-1412.
2. **Tomoyasu Fujii**, Jun Kamishikiryo, Tetsuo Morita. The Effect of Medroxyprogesterone Acetate on the Secretion of Lipoprotein Lipase in Mouse Mammary Tumor Cells. *BPB Reports.* 2021;4(4):130-135